Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

P-4228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I.N.R.A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. MAR 1985
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

Vol. 13
1984

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-13

Sommaire

Avant-Propos 5

COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

Première Partie - **Biochimie générale.**

I - Induction croisée des tréhalases et saccharases de l'hémolymphe d'abeilles 7

II - La structure du substrat détermine-t-elle celle de l'organisation des protomères enzymatiques en complexes fonctionnels adaptés ? 8

III - Relations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles au cours du jeune 9

IV - Régulation hormonale de la glycémie et de la lipémie de l'abeille 15

IV-1 - Comparaison de l'action des formes cyclique et linéaire de la somatostatine sur la glycémie de l'abeille 15

IV-2 - Action comparée des formes linéaire et cyclique de la somatostatine sur la lipémie de l'abeille 19

IV-3 - Effets anti-adrénergiques du propranolol sur la glycémie de l'abeille in vivo 23

IV-4 - Interaction de la somatostatine avec les effets de l'insuline d'abeille sur les relations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeille 27

V - Recherches sur la composition glucidique de l'hémolymphe des scolytes 42

VI - Techniques biochimiques 45

1 - Extraction des lipides de l'hémolymphe d'abeilles 45

2 - Conversions inter-photométriques 46

3 - Analyse comparée des spectres d'absorption des glucides révélés au "NEDIAC" 47

4 - Analyse des Auxines et des Gibbérellines 48

5 - Etalonnage des pigments photosynthétiques sur C.C.M. 50

6 - Les artefacts dans l'analyse des pigments photosynthétiques 58
VII - Déterminismes électromagnétiques dans les fonctions biochimiques fondamentales : une nouvelle pharmacologie 63
VIII - Projets de recherches 74
I - Induction enzymatique 74
II - Spécificité moléculaire et cinétique entre substrats osidiques et osidases 74
III - Action des champs électro-magnétiques sur les fonctions biochimiques de l'être Vivant 77
Deuxième Partie - **Biochimie Thanatologique et Crypto Toxicologie.**
I - Action de la deltaméthrine à dose infralétale sur la glycémie et la lipémie de l'abeille 80
II - Action de la toxine du bacillus thurengiensis sur la glycémie, l'amino-acidémie et les lipides abdominaux de Aedes 82
III - Action comparée d'une rickettsiose et du jeûne sur les glucides et les lipides de l'hémolymphe et du tissu adipeux de Gryllus bimaculatus 82
IV - Projets de recherches 88
Troisième Partie - **Biochimie Phytosémiologique.**
I - Mécanismes biochimiques d'action de l'Epal sur la résistance du Capsicum annuum au Phytophthora capsici 93
II - Mécanismes moléculaires associés à l'induction de résistance du poivron au Mildiou 101
III - Etude des glucides dans le liber de Pinus sylvestris en relation avec les phénomènes de résistance 106
IV - Implication de molécules phénoliques dans les phénomènes de résistance chez les Végétaux 119
V - Recherches sur les glucides des feuilles de pêcher en relation avec la résistance aux attaques par les pucerons 123
VI - Les traumatismes biochimiques Végétaux 127
VII - Traumatologie biochimique 138
VIII - Projets de recherches 139

Quatrième Partie - **Activités annexes.**

I - Relations avec la profession apicole 153
II - Visites de personnalités extérieures 153
III - Thésaurus et programmation de la recherche au département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie .. 153
IV - Enseignement supérieur 153
V - Interventions radio-télévisées 154
VI - Conseil scientifique du Parc Naturel Régional du Luberon 154
VII - Stages 154
VIII - Formation et responsabilités du personnel du laboratoire 155

COMPTE-RENDU ADMINISTRATIF

I - Exercice budgétaire 1984 157
II - Prévisions pour 1985 158

CONCLUSION 161

PUBLICATIONS 1984 163

AVANT PROPOS

Le développement des programmes du laboratoire de Biochimie continue de s' inscrire dans une double perspective axée sur les mécanismes moléculaires mis en oeuvre au cours de l' action des produits agropharmaceutiques d' une part sur l' Insecte, d' autre part sur le Végétal.

En termes de programmation de la recherche au département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie, les opérations de Recherches en cours au laboratoire se répartissent entre les 3 domaines suivants :

1er objectif 2e programme : **Etude des molécules originales agissant sur les cibles encore peu explorées ou modifiant soit le développement, soit le comportement des ravageurs** (pour 25%)

◊ Domaine concerné : recherches sur de nouvelles hormones de régulation du métabolisme (insectes et végétaux). Mode d' action biochimique de la toxine du Bacillus thuringiensis chez Aedes (collaboration avec l' Université de Montpellier).

2e objectif 1er programme : **Mode d' action physiologique et biochimique des produits agro-pharmaceutiques, et étude des phénomènes de résistance** (pour 50%)

◊ Domaine concerné : mécanismes moléculaires liés à la résistance de végétaux et des pathogènes ; mode d' action de produits stimulant la résistance (collaboration avec l' Université d' Avignon : laboratoire de physiologie et pathologie végétales)

3e objectif 3e programme : **Appréciation des effets non intentionnels des pesticides sur les organismes auxiliaires de l' agriculture** (pour 25%)

◊ Domaine concerné : protection toxicologique de l' Abeille : thanatologie et cryptotoxicologie moléculaires.

La vocation du laboratoire, à travers ces programmes, reste orientée, d' une part, du point de vue de l' éthique, vers la protection toxicologique de l' Etre Vivant (Abeille, Végétaux) et d' autre part, vue d' un angle plutôt épistémologique, vers la nécessité de bien connaître d' abord ce dont on devra se servir ensuite : entendons par là que pour pouvoir être en mesure d' interpréter correctement et ... utilement, les manifestations biochimiques de l' action de substances agro-pharmaceutiques sur un organisme vivant, il est nécessaire d' avoir, au préalable, analysé aussi largement que possible les états d' équilibre biochimique naturels, leurs limites, la forme de leurs variations, et les facteurs de leur régulation.

Les recherches en cours depuis plusieurs années, en particulier sur l' action de divers facteurs hormonaux communs à l' Abeille et aux Vertébrés (mais également sur certains processus thanatologiques d' origine physico-physiologique, et non toxicologique) se poursuivent donc au niveau des équilibres métaboliques entre glucides et lipides. De nombreux résultats expérimentaux originaux obtenus au cours des années 1980-1981 ne sont pas encore exploités, et exigeront un temps de travail important dans les mois, sinon l' année ou les 2 années à venir.

Cette mise à jour devrait revêtir un caractère **prioritaire,** car c' est à ce prix que l' interprétation des données expérimentales de toxicologie moléculaire pourra s' appuyer sur une infrastructure suffisamment large et étayée. L' enjeu en est de taille : il s' agira de rechercher d' une part les seuils de réversibilité des processus thanatogéniques (avec leur incidence évidente sur l' apparition des phénomènes de résistance) et d' autre part les limites inférieures extrêmes de toxicité, ne se manifestant par aucun symptôme visible ni par la présence de résidus en quantités décelables, mais néanmoins susceptibles d' interférer avec d' autres facteurs (climatiques, patho-

logiques, etc ...) : nous avons attribué à cet aspect des programmes, la dénomination de "cryptotoxicologie".

Tous ces concepts seront développés dans les divers chapitres du compte rendu, sous forme de résultats, de discussions et de projets.

Tous les projets proposés sont matériellement réalisables, mais non dépourvus de facteurs limitants : l' équipe permanente est en trop petit nombre (3 personnes, dont 1 seul chercheur MR, 1 technicien 3B et 1 technicien 5B) et l' aménagement actuel des locaux **disponibles** ne permet d' accueillir des chercheurs extérieurs que dans des proportions très réduites. La situation antérieure, qui était celle de la saturation, évolue maintenant vers l' asphyxie : c' est aussi une forme de processus thanatologique dans lequel le seuil d' irréversibilité constitue un risque à prendre au sérieux : la conséquence immédiate et inévitable est qu' il sera **matériellement impossible** d' aborder toute opération nouvelle de quelque nature qu' elle soit avant l' aboutissement **complet** de celles qui sont déjà engagées, jusqu' à leurs conclusions les plus rigoureusement établies et publiées.

Première Partie

BIOCHIMIE GENERALE

I - INDUCTION CROISEE DES TREHALASES ET SACCHARASES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES. (M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN).

L'analyse des données numériques et l'interprétation des résultats obtenus au cours de deux périodes sabbatiques (1979 et 1983) du DR. MORGAN, professeur d'enzymologie à l'Université de Lancaster (GB), a été poursuivie sous la forme épistolaire d'une collaboration qui peut être considérée comme permanente. Il est regrettable, à ce sujet, qu'aucun statut d'association de type international ne soit en vigueur afin de faciliter et d'assouplir les échanges.

L'induction des saccharases et des tréhalases par le saccharose et le tréhalose per os, dont les résultats ont été présentés dans le C.R. 1983, a fait l'objet de plusieurs publications (Comp. Biochem. Physiol., **79B**(1), 75-80 et IRCS Med. Sci./Biochemistry, **12**, 546-547 et 769-770 ; C.R. Soc. Biol., **178**, 29-37) mettant en évidence l'existence d'un complexe enzymatique initial possédant une activité tréhalasique et, pour certains de ses composants moléculaires, une activité commune saccharasique et pNP-α-D-glucosidasique, c'est-à-dire en apparence non spécifique. En outre l'apparition de nouvelles formes glucidiques polyosidiques, suggère l'apparition d'activités de trans-glycosylation pouvant être dues au complexe osidasique lui-même (TAKENAKA et al., 1976. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ., **16**, 1-9).

Les premières phases (5 premiers jours) de l'induction par le saccharose administré en continu suggèrent l'hypothèse d'une adaptativité du complexe au substrat exogène, tandis qu'à partir du 7e jour se met en place une hyper activité spécifiquement saccharasique. Les deux phases sont sensibles à l'action du chloramphénicol, inhibiteur de la synthèse protéique dans les mitochondries d'Insectes, où se trouvent précisément emmagasinées des "réserves" moléculaires de tréhalases (BRANDT et al., 1979, Can. J. Biochem., **57**, 1210-1215).

Enfin, l'étude des propriétés cinétiques spécifiques des fractions respectives d'activité tréhalasique et saccharasique du complexe (Int. J. Biochem., **16**(8), 939-941) apporte une confirmation à la théorie "stoechiométrique" des enzymes coopératives, présentée à l'Académie des Sciences le 19-12-1983, et contribue à étayer une nouvelle conception des relations d'inter dépendance entre les enzymes et leurs substrats (cf. chap. II).

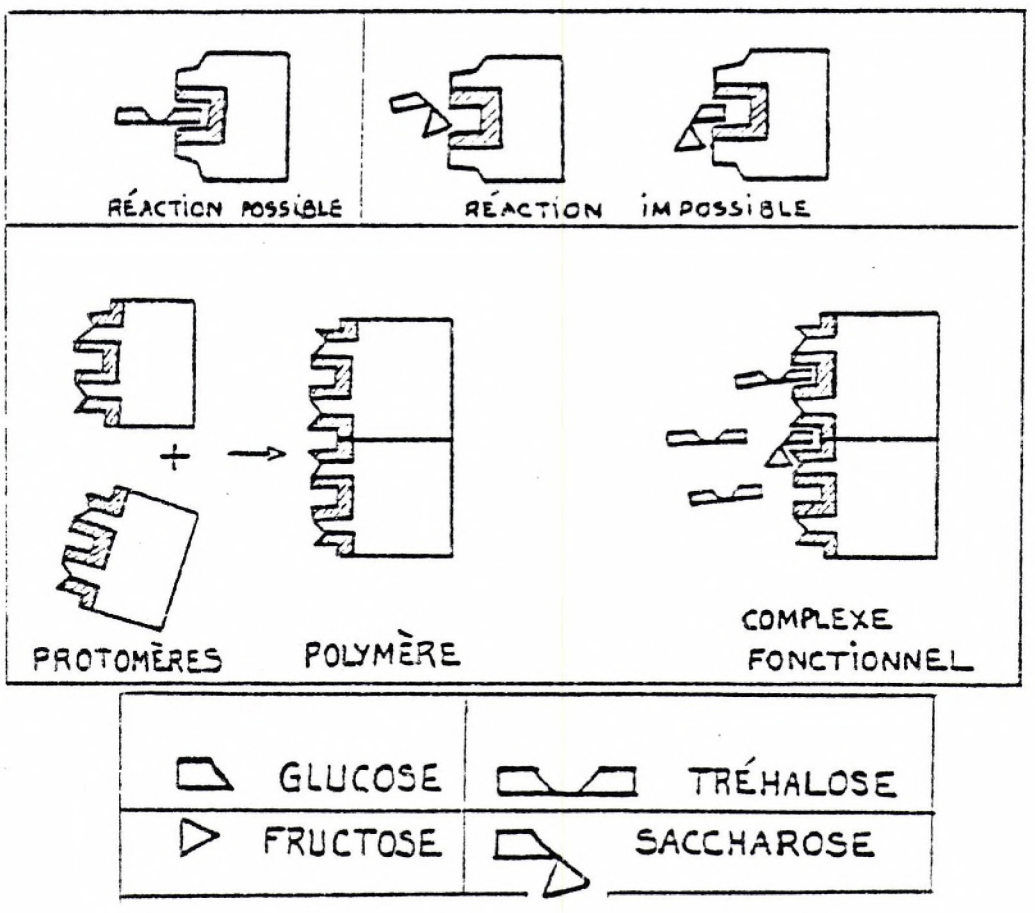
Les résultats obtenus à court terme (12 heures) par injection de tréhalose aux Abeilles, et faisant apparaître, de nouveau, des mécanismes chronobiologiques, sont sous presse (Comp. Biochem. : accepté le 21-6-84, épreuves corrigées le 5-12-84).

II - LA STRUCTURE DU SUBSTRAT DETERMINE-T-ELLE CELLE DE L'ORGANISATION DES PROTOMERES ENZYMATIQUES EN COMPLEXES FONCTIONNELS ADAPTES ?

(M. BOUNIAS).

Le modèle stoechiométrique (C.R. Acad. Sc., 1983, **297**(III), 583-588) rend compte de diverses mesures expérimentales chez les Insectes et chez les Végétaux. L'opposition entre tréhalases et saccharases, respectivement douées de propriétés coopératives positives (n=1,41 ± 0,02) et négatives (n=0,635 ± 0,025) suggère un mécanisme dans lequel le mode d'association des protomères pourrait faire apparaître un nombre réduit de sites enzymatiques non spécifiques (fig. 1). Cette hypothèse, présentée au cours d'une communication orale (journées de l'Abeille, Palais des Papes Avignon, 6-4-1984), a fait l'objet d'une publication préliminaire (Rev. Fr. Apic., sous presse).

Fig. 1



L'une des explications les plus directes serait celle selon laquelle c'est la structure du substrat lui-même qui, par le jeu des affinités moléculaires, réunit les protomères enzymatiques du complexe de manière à faire apparaître la structure enzymatique sous une forme qui lui soit adaptée.

Cette hypothèse mériterait d'être étudiée de manière approfondie car elle permettrait peut-être d'expliquer certaines phases des processus d'évolution spontanée des aggrégats de matière organique vers la cellule fonctionnelle proche du Vivant.

III - RELATIONS FONCTIONNELLES GLUCIDO-LIPIDIQUES DANS L'HEMOLYMPHE D'ABEILLES AU COURS DU JEUNE. (M. BOUNIAS).

Le jeûne constitue l'une des voies d'approche expérimentale les plus simples visant à éprouver les capacités régulatrices de l'organisme vivant. L'Abeille est peu résistante, ce qui faisait conclure à BEUTLER (1937, Z. Vergl. Physiol., **24**, 71-115), constatant un épuisement des réserves au bout de 24 heures, que "l'Abeille ne régule pas sa glycémie".

La glycémie et la lipémie d'Abeilles naissantes a donc été analysée au moment du prélèvement dans les alvéoles encore operculés, puis à partir de lots d'individus conservés à l'obscurité à 21 ± 1°C pendant : 7 h, 21 h, 30 h et 48 h. Les résultats concernant les glucides sont indiqués dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 - Variations de la glycémie de l'Abeille au cours d'une période de 48 heures de jeûne. Les moyennes ($\bar{x}$) (mM) et les écarts-types (s) proviennent de (N) mesures.

	Trehalose			Glucose		
	$\bar{x}$	(N)	S	$\bar{x}$	(N)	S
controls	32.4	(3)	3.0	3.65	(3)	0.19
7h starvation	15.6	(3)	0.4	2.89	(3)	0.32
21h starvation	5.8	(3)	0.4	2.61	(3)	0.35
30h starvation	21.1	(3)	1.9	7.09	(3)	0.72
48h starvation	3.9	(2)	0.3	1.72	(2)	0.03

A partir de ces données, un certain nombre de relations fonctionnelles apparaît déjà.

Les relations entre tréhalose et glucose (fig. 2A) se traduisent, pour l'ensemble des points, par une corrélation faible : $\rho_1 = 0,494$, (N=5) : t=0,984 (P=0,39) ; $a_1 = 2,20$; $b_1 = 0,09$. Toutefois, le point 30 h s'écarte manifestement d'une relation liant les précédents et le suivant, soit : $\rho_2 = 0,913$; t=3,88 (P=0,03) ; $a_2 = 1,91$; $b_2 = 0,056$. Cette dernière équation se rapproche de celle observée, dans les mêmes limites de la tréhalosémie, chez des Abeilles "témoins" : $\rho_0 = 0,874$ (N=8) : t=4,40 (P=0,004) ; $a_0 = 1,65$; $b_0 = 0,068$.

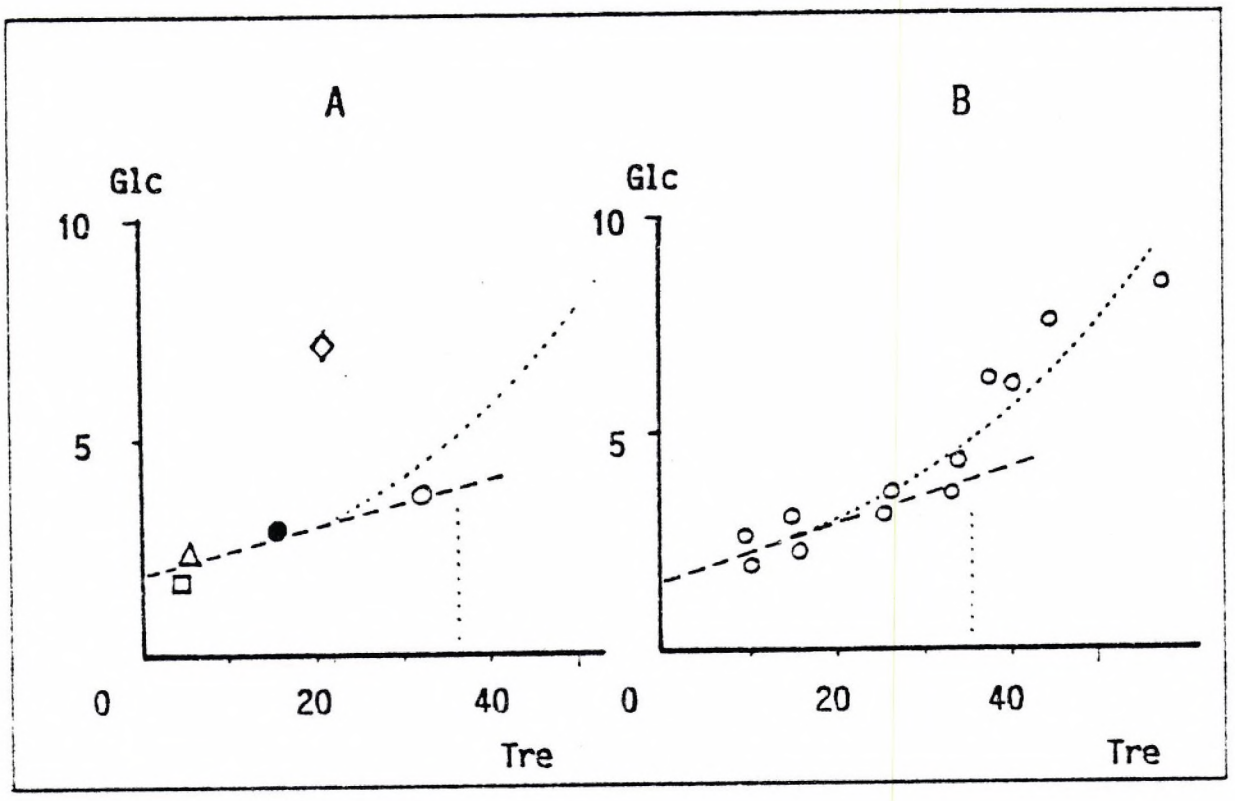


Fig. 2

Les pentes b_2 et b_0, comparées d'après l'épreuve de t, ne sont pas significativement différentes (t=0,667 : P=0,52).

Le jeûne entraîne donc, par rapport à l'état initial d'équilibre physiologique, une hyperglucosémie spécifique au temps To + 30 h.

Les résultats d'analyse de la lipémie sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 - Variations de la lipémie de l'Abeille au cours d'une période de 48 h de jeûne. Les moyennes ($\bar{X}$) (mM) et les écarts-types (s) proviennet de (N) mesures.

Lipid classes	controls $\bar{x}$ (N)/SD	7 h $\bar{x}$ (N)/SD	21 h $\bar{x}$ (N)/SD	30 h $\bar{x}$ (N)/SD	48 h $\bar{x}$ (N)/SD
Phospholipids (PL)	3.46 (3)0.43	2.16 (3)0.14	3.11 (3)0.66	3.04 (3)0.31	2.73 (3)0.24
Steroïds (St)	0.28 (4)0.008	0.12 (4)0.015	0.066 (3)0.0047	0.19 (4)0.013	0.053 (4)0.014
fatty acids FA ①	0.054 (2)0.011	0.0145(2)0.003	0.053 (2)0.010	0.050 (2)0.010	0.021 (2)0.004
fatty acids FA ②	0.0115(2)0.0023	0.0055(2)0.0011	0.052 (2)0.010	0.0009(2)0.0003	0.00125(2)0.0003
fatty acids FA ③	0.0195(2)0.04	0.0495(2)0.002	0.031 (2)0.008	0.054 (2)0.002	0.061 (2)0.002
monoacyl-glycerols (MG)	0.0135(2)0.0024	0.0275(2)0.005	0.010 (2)0.005	0.0045(2)0.001	0.010 (2)0.002
diacyl 1-2-glycerols (DG 1-2)	0.11 (3)0.01	0.05 (3)0.008	0.0235(2)0.0015	0.068 (3)0.009	0.021 (3)0.005
diacyl 1-3 glycerols (DG 1-3)	0.018 (2)0.006	0.0026(2)0.0013	0.0275(2)0.006	0.0095(2)0.0035	0.00065(2)0.0003
triacyl-glycerols TG ①	0.046 (2)0.001	0.0515(2)0.002	0.0205(2)0.0065	0.046 (2)0.003	0.0605 (2)0.002
triacyl-glycerols TG ②	0.031 (2)0.001	0.021 (2)0.001	0.0055(2)0.0025	0.021 (2)0.001	0.005 (2)0.001
fatty acids + glycerides	0.303	0.222	0.223	0.254	0.180

fatty acids : ① ⩽ C18 ; ② = C18-C20 ; ③ ⩾ C24.
triacylglycerols : ① ⩽ C16 ; ② ⩾ C18.

Ces données numériques permettent de dégager un certain nombre de relations entre les classes de lipides. Le tableau 3 en donne les principaux paramètres statistiques.

Tableau 3 - Relations fonctionnelles moléculaires entre composants lipidiques.

x / y	corrélation ρ	$P_{(\rho)}$	Régression : y = a + bx a	b	σ_b
Steroïds/(DG 1-2 + TG ②)	0.990	0.001	0.0033	1.956	0.16
DG 1-2/TG ②	0.956	0.01	0.0022	3.12	1.72
Steroïds/(F.A. + glycerides)	0.954	0.01	-0.324	1.97	0.36
FA ② / TG ①	-0.936	0.02	0.083	-1.54	0.33
DG 1-3 / TG ①	-0.923	0.02	0.043	-0.70	0.17
FA 1 / PL	0.915	0.03	0.084	0.042	0.010
DG 1-3 / FA ②	0.864	0.06	0.0053	0.448	0.15
FA ① / DG 1-3	0.858	0.06	0.0207	1.59	0.55
FA ③ / TG ②	0.855*	0.14			
MG / PL	-0.694	0.19	0.0488	-0.012	0.007
FA ① / TG ①	-0.653	0.23	0.076	-0.83	0.55
FA ① / MG	-0.646	0.24	0.057	-1.43	0.97

* Points 21h exceptés (N=4 couples)

Dans certains cas (tableau 4), les corrélations ne sont significatives que si le point initial est exclu : ces relations apparaissent

donc comme spécifiques des conditions physiologiques caractéristiques de jeûne.

Tableau 4 - Corrélations fonctionnelles intra-lipidiques propres aux conditions de jeûne (N=4 couples).

x / y	corrélation ρ	$P_{(\rho)}$	Régression : y = a + bx a	b	σ_b
TG ① / FA ③	0.962	0.038	-0.018	1.29	0.25
	(0.589)	0.290	(0.023)	(0.51)	0.40
DG 1-3 / FA ③	-0.921	0.079	0.053	-0.88	0.26
	(-0.806)	0.099	(0.034)	(-0.52)	0.22

Ces relations sont illustrées par la figure 3.

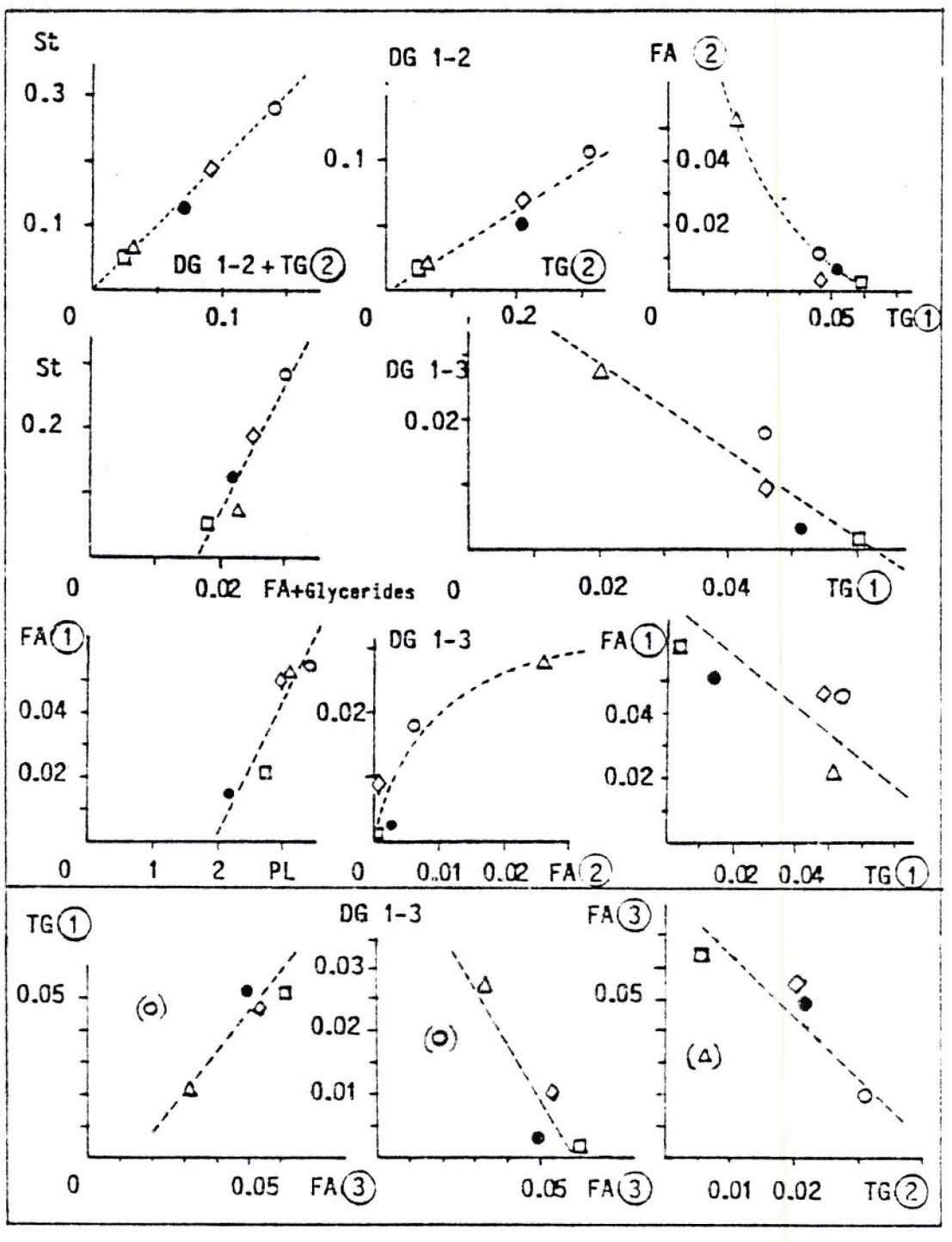


Fig. 3 - Corrélations fonctionnelles intra-lipidiques (mM) :
O = témoins ; ● = 7 h ; Δ = 21 h ; ◊ = 30 h ; □ = 48 h.

Il est intéressant de remarquer que le groupe constitué des acides gras et des glycérides (à l'exception des DG 1-2 et des TG 2, c'est-à-dire "longs") se maintient à un niveau global constant (fig. 4) comme l'indique le calcul de corrélation en fonction du temps, ρ=-0,029 (P=0,64) ; pente : b=-0,00003 soit : ligne horizontale.

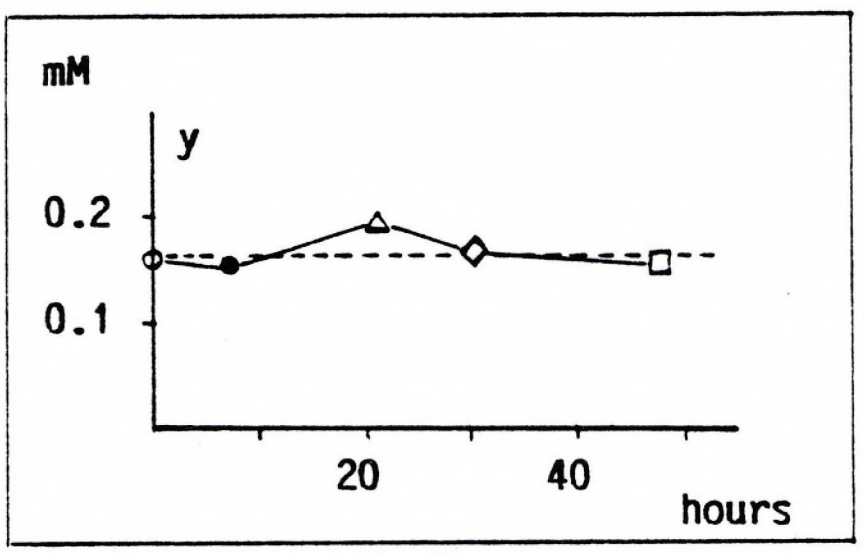


Fig. 4 - Invariance quantitative du groupe : (ac. gras + glycérides) sauf DG 1-2 et TG 2 .

Parmi les glucides, seul le tréhalose a présenté des relations hautement significatives avec les lipides. Les résultats, indiqués dans le tableau 5 sont illustrés par la fig. 5.

Tableau 5 - Relations moléculaires entre glucides et lipides de l'hémolymphe d'abeilles au cours du jeûne.

	corrélation		Régression : y = a + bx		
y / x	ρ	$P_{(\rho)}$	a	b	σ_b
steroïds/trehalose	0.993	0.0007	0.0170	0.0080	0.0005
DG 1-2/trehalose	0.995	0.0004	0.0052	0.0031	0.00017
TG ② /trehalose	0.974	0.005	0.0020	0.0009	0.00014
(DG 1-2+TG②)/trehalose	0.998	0.0001	0.0073	0.0040	0.00015
FA ③ /trehalose	-0.529	0.35	0.055	-0.0008	0.0007

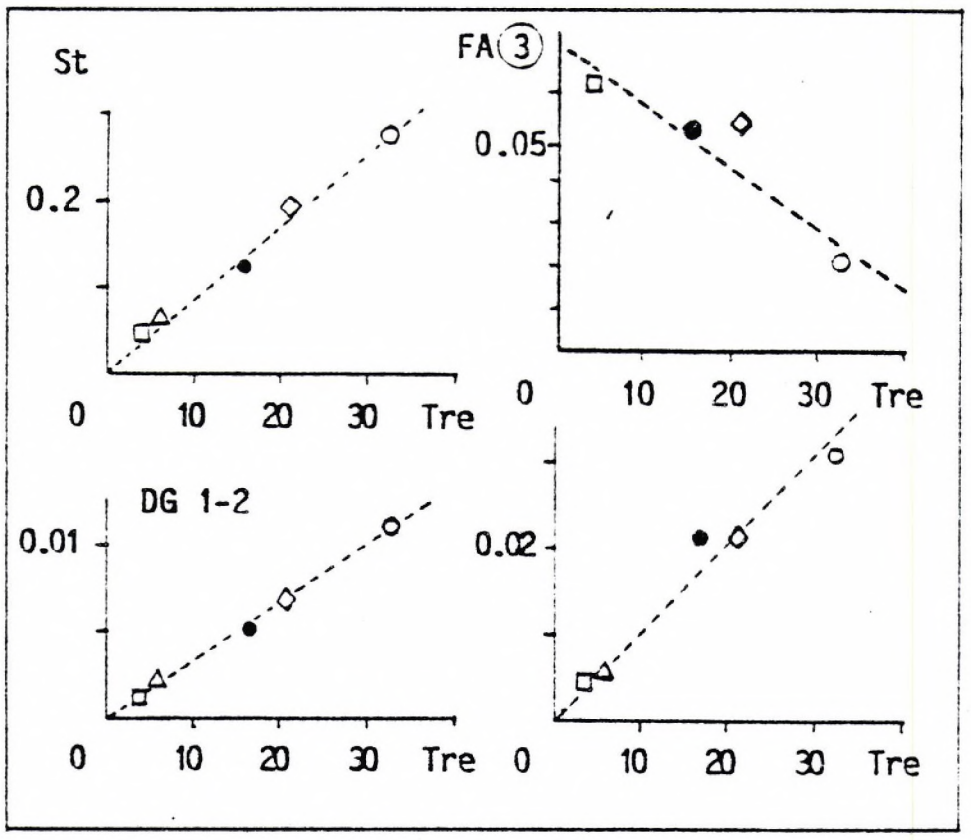


Fig. 5 - Relations fonctionnelles glucido-lipidiques (mM).

L'ensemble des résultats a fait l'objet d'une analyse détaillée au terme de laquelle il a été possible de proposer un schéma physiologique interprétatif des phénomènes observés : ce schéma est illustré (au stade actuel de la réflexion) par la figure 6.

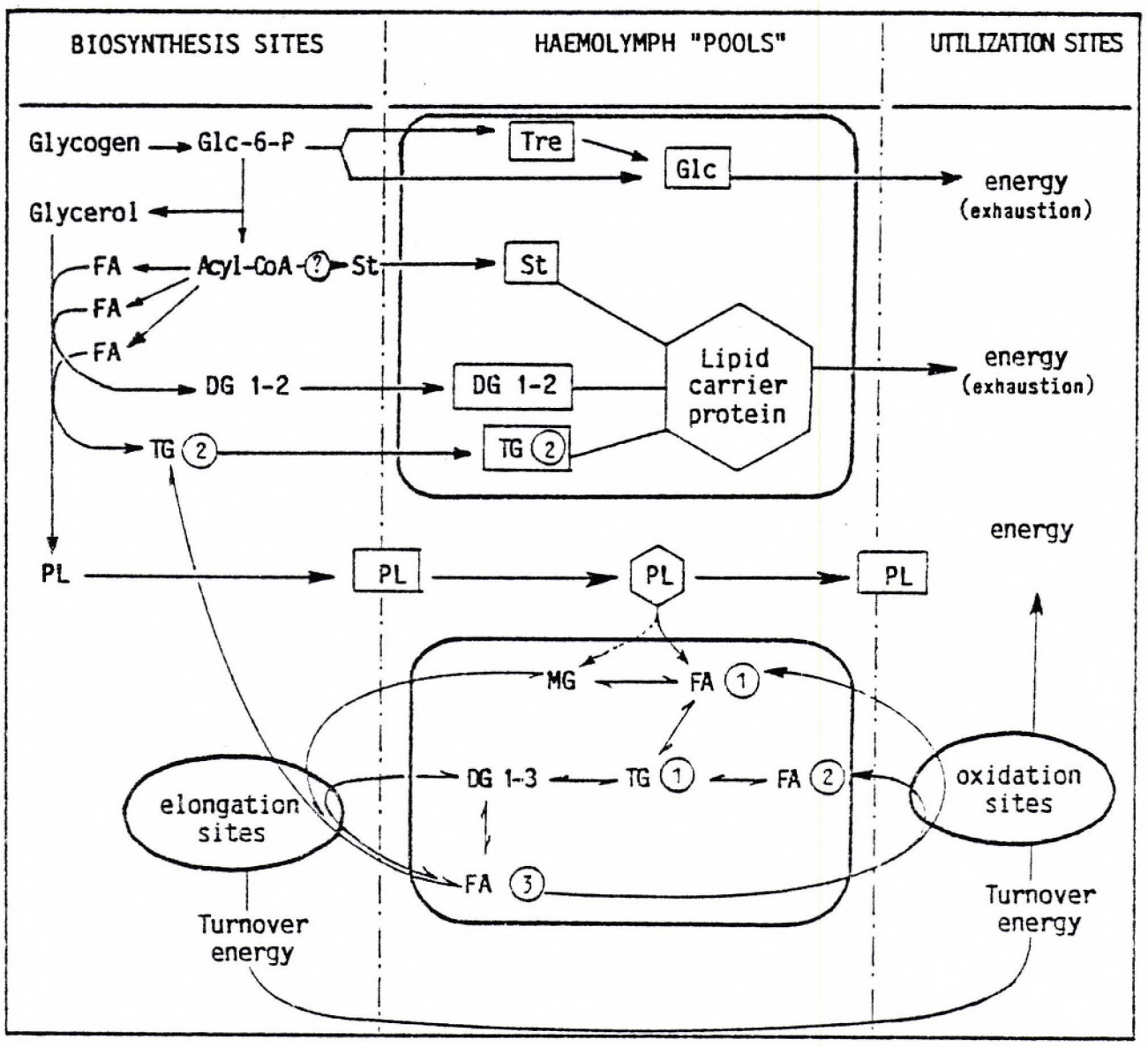


Fig. 6 - Schéma hypothétique des relations fonctionnelles mises en oeuvre au cours du jeûne, chez l' Abeille.

IV - REGULATION HORMONALE DE LA GLYCEMIE ET DE LA LIPEMIE DE L'ABEILLE.

Ces recherches, abordées depuis près de 10 ans au niveau de la glycémie, ont été étendues à partir de 1980 à la lipémie et aux relations fonctionnelles glucido-lipidiques, qui constituent maintenant l'objectif essentiel.

Il est de toute première urgence d'aboutir dans les plus brefs délais au dépouillement complet de la masse de données accumulées au cours des années précédentes, d'une part afin de disposer du "support logistique" que ces résultats constituent pour les recherches toxicologiques ultérieures, et d'autre part, ce qui n'est pas entièrement négligeable, afin d'en sauvegarder l'originalité (ces travaux bénéficiaient jusqu'ici d'une avance absolue à l'échelle internationale).

Cette avance va devenir de plus en plus fragile, car les publications déjà parues ont eu un impact extérieur tangible. Un exemple très concret est encore récemment venu en témoigner : à la suite des travaux du laboratoire (BOUNIAS et PACHECO, 1979 : C.R. Acad. Sc., **289D**, 201-204 ; BOUNIAS 1979 : C.R. Soc. Biol., **173**, 1031-1036) montrant l'existence chez l'abeille, de récepteurs sensibles à l'action du glucagon de Vertébrés, l'équipe allemande du Professeur PFEIFFER a réussi à isoler une molécule endogène d'abeille analogue au glucagon. Sa purification est en cours et une délégation conduite par le DR. Volker MAIER doit venir au laboratoire de biochimie en 1985 pour y étudier les moyens d'analyser "en retour" l'action de ces préparations par injections aux abeilles.

IV - 1 - Comparaison de l'action des formes cyclique et linéaire de la somatostatine sur la glycémie de l'Abeille. (M. BOUNIAS).

La glycémie de l'Abeille a été analysée au temps To (injections) puis au bout de 5-10 mn, 45 mn, 90 mn, 135 mn et 180 mn après injection de l'une ou l'autre des deux formes de somatostatine de Vertébrés. Les doses injectées sont de 50 ng par abeille (soit 400 µg par Kg ou la valeur de 1 mg/l en admettant une volémie de 50 µl par abeille). Dans le cas de la forme cyclique, des injections de 500 ng par abeille ont également dû être effectuées.

La figure 7 présente les résultats cinétiques.

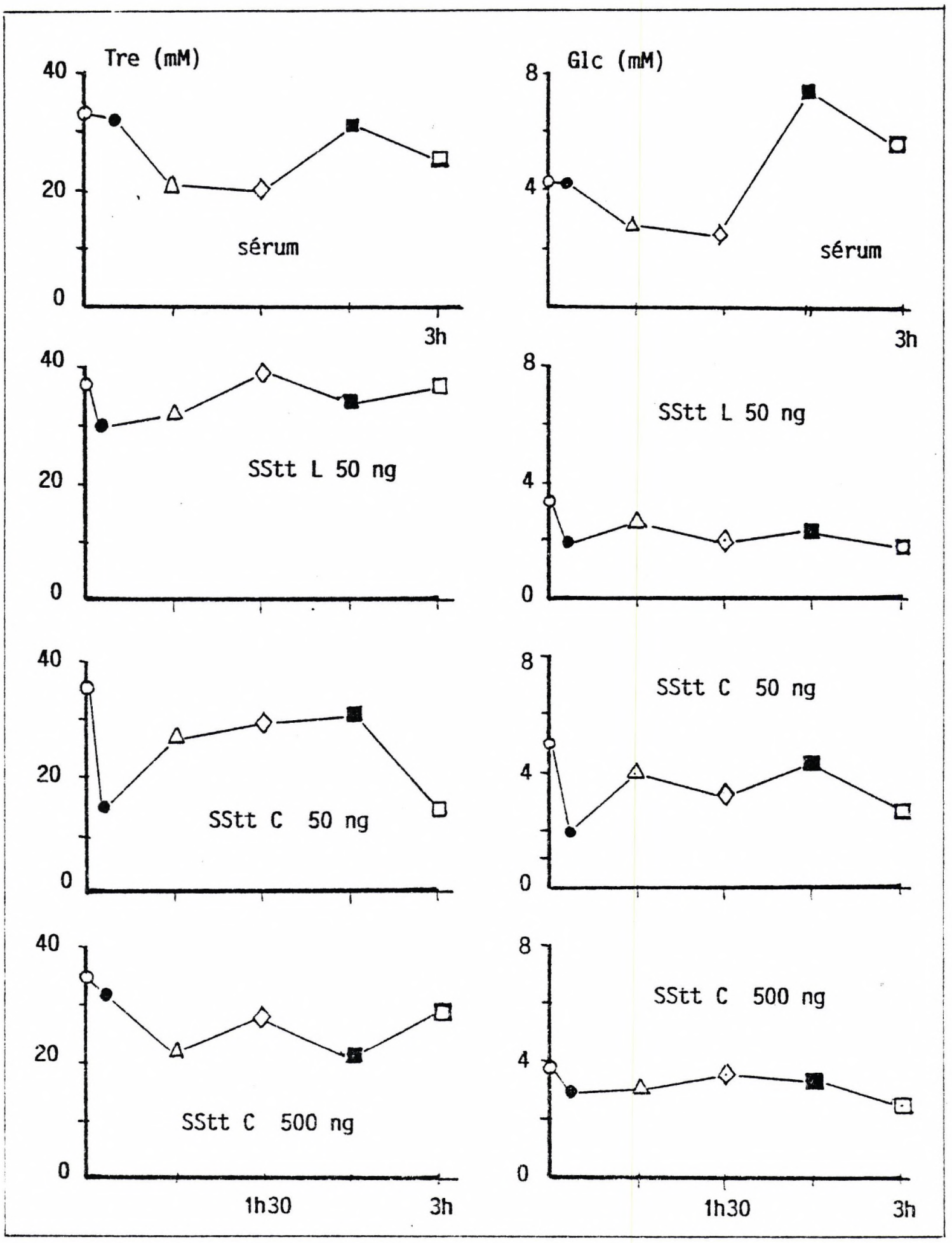


Fig. 7 - Cinétiques de variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc), (mM), après injection de somatostatine linéaire (SStt-L) ou cyclique (SStt-C).

A partir des données numériques (tableaux 6 et 7) il est possible de comparer statistiquement ces variations, sous plusieurs angles de vue. En particulier, l'amplitude des oscillations témoigne de l'"amortissement", par la somatostatine, des réactions hormonales régulatrices endogènes. Les résultats montrent que la forme linéaire agit significativement dès 50 ng par abeille, tandis que la forme cyclique agit à doses 10 fois plus élevées. Les graphiques obtenus dans ce dernier cas sont pratiquement superposables aux premiers : cette observation, traduite en terme de corrélations, est illustrée par la figure 8.

Tableau 6

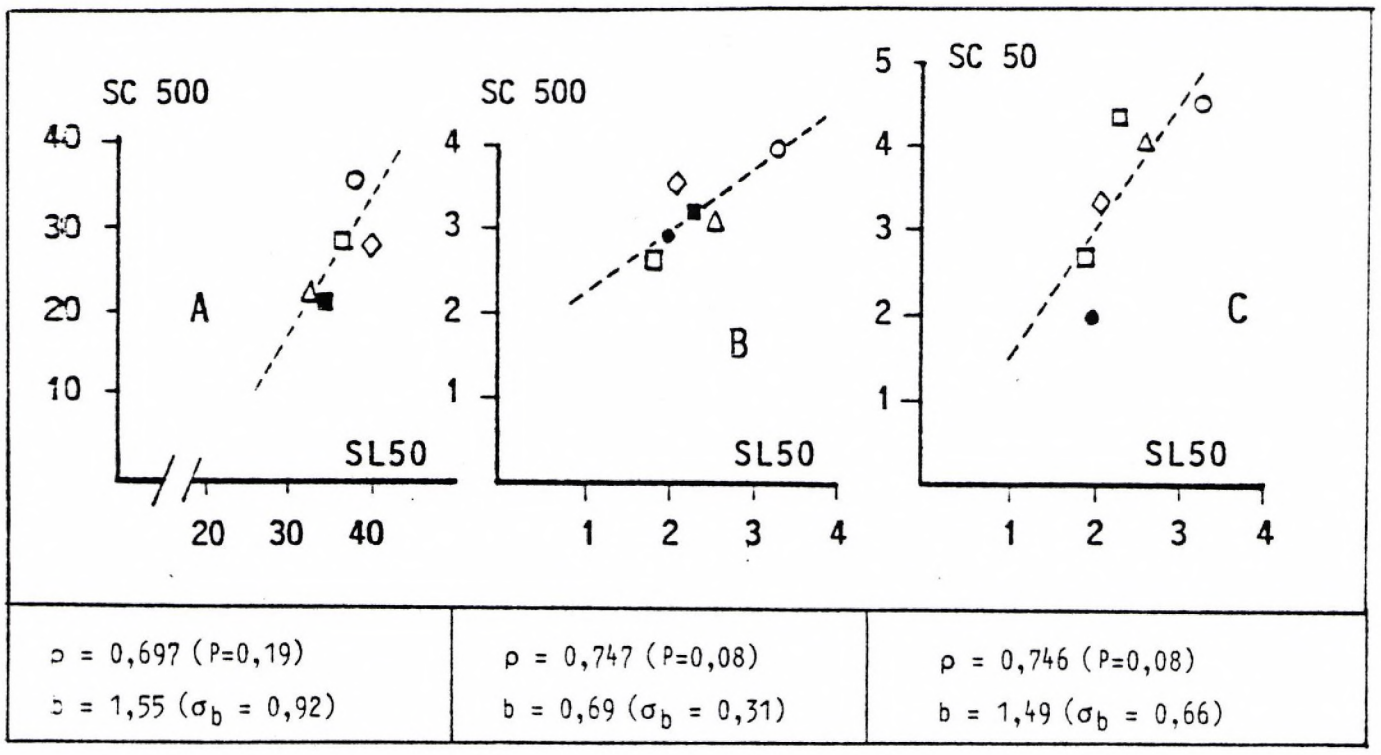
Variations des concentrations en tréhalose (mM) dans l'hémolymphe d'abeilles après injection de sérum pur ou en présence de somatostatine (linéaire ou cyclique). Les moyennes et les écarts-types (entre parenthèses) sont donnés pour N mesures. L'indice (^{a}) indique une différence significative (à $P<0,05$) relativement aux valeurs initiales.

Temps après injection (mn)	Sérum N=4	Somatostat. linéaire: 50ng N=3	Somatostat. 50 ng N=3	cyclique 500 ng N=3
0(Témoins)	34,3(7,8)	37,4(3,2)	34,1(1,7)	35,7(3,2)
10-15	32,6(3,8)	29,4(1,4)	13,5(1,5)^a	31,6(3,9)
45	21,3(1,9)^a	32,8(3,8)	26,6(3,8)	21,4(3,1)
90	20,4(1,8)^a	39,6(2,6)	28,7(4,7)	27,6(4,2)
135	31,7(6,0)	33,6(2,9)	29,8(3,2)	20,5(2,4)
180	26,2(7,5)	36,0(1,5)	14,1(1,1)^a	28,6(2,3)
moyennes générales	27,75	34,80	24,47	27,56
N=6 comparaisons par P(t)		(0,13) (0,14) (0,69) (0,60) (0,51) (0,120)		
variances générales	36,00	13,18	72,29	34,29
N=6 comparaisons par P(F)		(0,15) (0,043) (0,22) (0,23) (0,48) (0,16)		

Tableau 7

Variations des concentrations en glucose (mM) dans l'hémolymphe d'abeilles après injection de sérum pur ou en présence de somatostatine (linéaire ou cyclique). Les moyennes et les écart-types (entre parenthèses) sont donnés pour N mesures. L'indice ([a]) indique une différence significative (à $P<0,05$) relativement aux valeurs initiales.

temps après injections (mn)	Sérum N=4	somatostatine linéaire : 50 ng N=3	Somatostatine cyclique 50 ng N=3	500 ng N=3
0(Témoins)	4,21(1,07)	3,26(0,32)	4,47(0,60)	3,86(2,78)
10-15	4,20(1,31)	1,98(0,10)[a]	1,90(0,19)[a]	2,87(0,19)
45	2,98(0,88)	2,52(0,14)	4,00(0,32)	3,06(0,29)
90	2,55(0,94)	2,05(0,21)[a]	3,32(0,34)	3,55(0,32)
135	7,61(0,67)[a]	2,28(0,43)	4,35(0,44)	3,22(0,28)
180	5,75(0,77)	1,87(0,19)[a]	2,65(0,19)[a]	2,54(0,15)
moyennes générales	4,55	2,33	3,45	3,18
N=6 comparaisons par P(t)		(0,071) (0,133) (0,675) (0,138) (0,087) (0,074)		
variances générales	3,497	0,260	1,040	0,220
N=6 comparaisons par P(F)		(0,006) (0,077) (0,057) (0,10) (0,004) (0,43)		



ρ = 0,697 (P=0,19) b = 1,55 (σ_b = 0,92)	ρ = 0,747 (P=0,08) b = 0,69 (σ_b = 0,31)	ρ = 0,746 (P=0,08) b = 1,49 (σ_b = 0,66)

Fig. 8 - Corrélations entre les variations de la glycémie consécutives à l'injection de somatostatine linéaire (50 ng par abeille : SL50) et de somatostatine cyclique (50 ou 500 ng par abeille : SC50 ou SC500).

A : Tréhalose (mM) ; B et C : Glucose (mM).

o = Tréhalose ; ● = 10-15 mn ; Δ = 45 mn ; ◊ = 90 mn ; ■ = 135 mn ; □ = 180 mn.

Il apparaît, **en ce qui concerne les glucides,** que la somatostatine linéaire neutralise les réactions hormonales endogènes responsables des oscillations consécutives au traumatisme que constitue l'injection. L'action de la forme cyclique n'aboutit au même résultat, dans les mêmes délais, que sous réserve d'en injecter une dose très supérieure, certainement en raison d'une moindre activité, mais peut-être également, par l'accélération possible de l'ouverture du cycle, à fortes concentrations.

IV - 2 - Action comparée des formes linéaire et cyclique de la somatostatine sur la lipémie de l'Abeille. (M. BOUNIAS).

L'analyse des lipides a été réalisée dans l'hémolymphe provenant des mêmes échantillons que ceux précédemment utilisés pour suivre l'évolution de la glycémie. Les résultats numériques sont indiqués dans les tableaux 8, 9, 10 et illustrés par la figure 9.

Tableau 8 - Variations de la lipémie de l' Abeille (mM) après injection de sérum. Les moyennes et les écarts-types (s) sont donnés pour le nombre de mesures indiqué entre parenthèses.

	Temps (mn)					
Sérum	0	10	45	90	135	180
Phospholipides	2,86(6) s=0,74	3,80(4) s=1,01	3,92(4) s=1,04	2,80(4) s=0,51	4,14(4) s=1,08	3,575(4) s=0,925
Monoglycérides	0,0267(4) s=0,015			0,081(2)	0,101(2)	0,151(2)
Acides gras	0,061(2) s=0,025	0,062(4) s=0,023	0,072(4) s=0,036	0,0585(4) s=0,032	0,0645(4) s=0,031	0,137(4) s=0,078
Stéroïdes	0,285(2) s=0,025	0,525(2) s=0,03	0,38(2) s=0,02	0,185(2)	0,475(2)	0,335(2)
Diglycérides 1-2	0,22(2)	0,455(2)	0,32(2)	0,186(2)	0,49(2) s=0,02	0,23(2) s=0,03
Diglycérides 1-3	0,066(3) s=0,017	0,098(3) s=0,017	0,081(3) s=0,017	0,046(3) s=0,014	0,129(3) s=0,026	0,109(3) s=0,026
Triglycérides	0,046(3) s=0,024	0,046(3) s=0,025	0,0527(3) s=0,0318	0,037(3) s=0,0226	0,054(3) s=0,028	0,0407(3) s=0,021

Tableau 9 - Variations de la lipémie de l' Abeille (mM) après injection de somatostatine linéaire (50 ng par individu). Les moyennes et les écarts-types (s) sont donnés pour le nombre de mesures indiqué entre parenthèses.

	Temps (mn)					
SStt lin.	0	10	45	90	135	180
Phospholipides	3,52(2)	2,91(2)	3,29(4) s=0,06	3,34(3) s=0,13	3,05(6) s=0,325	2,94(3) s=0,28
Monoglycérides		S=0,11		0,012(2)		0,021(3) s=0,010
Acides gras	0,128(5) s=0,042	0,054(2)	0,116(4) s=0,064	0,038(2) s=0,006	0,055(4) s=0,0073	0,041(2) s=0,004
Stéroïdes	0,59(5) s=0,20	0,38(3) s=0,079	0,635(6)	0,435(2) s=0,005	0,285(4) s=0,024	0,345
Diglycérides 1-2	0,25(5) s=0,09	0,20(3) s=0,03	0,290(4) s=0,039	0,166(2) s=0,023	0,11(4) s=0,040	0,117(2)
Diglycérides 1-3	0,056(5) s=0,015	0,0475(2) s=0,008	0,0737(4) s=0,017	0,069(2) s=0,006	0,0472(4) s=0,0076	0,0445(2) s=0,0049
Triglycérides	0,0477(3) s=0,00987	0,0235(2) s= 13%	0,0275(4) s=0,0034	0,0215(2)	0,0177(4) s=0,010	0,0115(2)

Tableau 10 - Variations de la lipémie de l'Abeille (mM) après injection de somatostatine cyclique (50 ng par individu). Les moyennes et les écarts-types (s) sont donnés pour le nombre de mesures indiqué entre parenthèses.

SStt cycl.	Temps (mn)					
Classes de lipides	0	10	45	90	135	180
Phospholipides	3,16(2) s=0,08	2,44(2)	2,67(2)	2,84(2)	2,55(2)	2,12(2)
Monoglycérides	0,020(3) s=0,011	0,0032(3) s=0,0019	0,0115(2) s=0,003	0,0205(2) s=0,003	0,025(2) s=0,003	0,020(2) s=0,006
Acides gras	0,146(7) s=0,10	0,0135(4) s=0,0041	0,087(2) s=0,006	0,024(2) s=0,007	0,0185(2) s=0,005	0,021(2) s=0,002
Stéroïdes	0,385(4) s=0,037	0,155(4) s=0,024	0,221(4) s=0,032	0,30(4) s=0,033	0,223(4) s=0,0325	0,156(4) s=0,029
Diglycérides 1-2	0,145(4) s=0,021	0,050(4) s=0,014	0,095(4) s=0,015	0,061(4) s=0,012	0,038(4) s=0,0093	0,024(4) s=0,007
Diglycérides 1-3	0,0595(4) s=0,042	0,047(4) s=0,035	0,0775(4) s=0,032	0,063(4) s=0,024	0,036(4) s=0,018	0,0287(4) s=0,017
Triglycérides	0,0368(4) s=0,00939	0,0062(4) s=0,00315	0,01585(4) s=0,0071	0,0136(4) s=0,0062	0,00617(4) s=0,00338	0,0068(4) s=0,0034

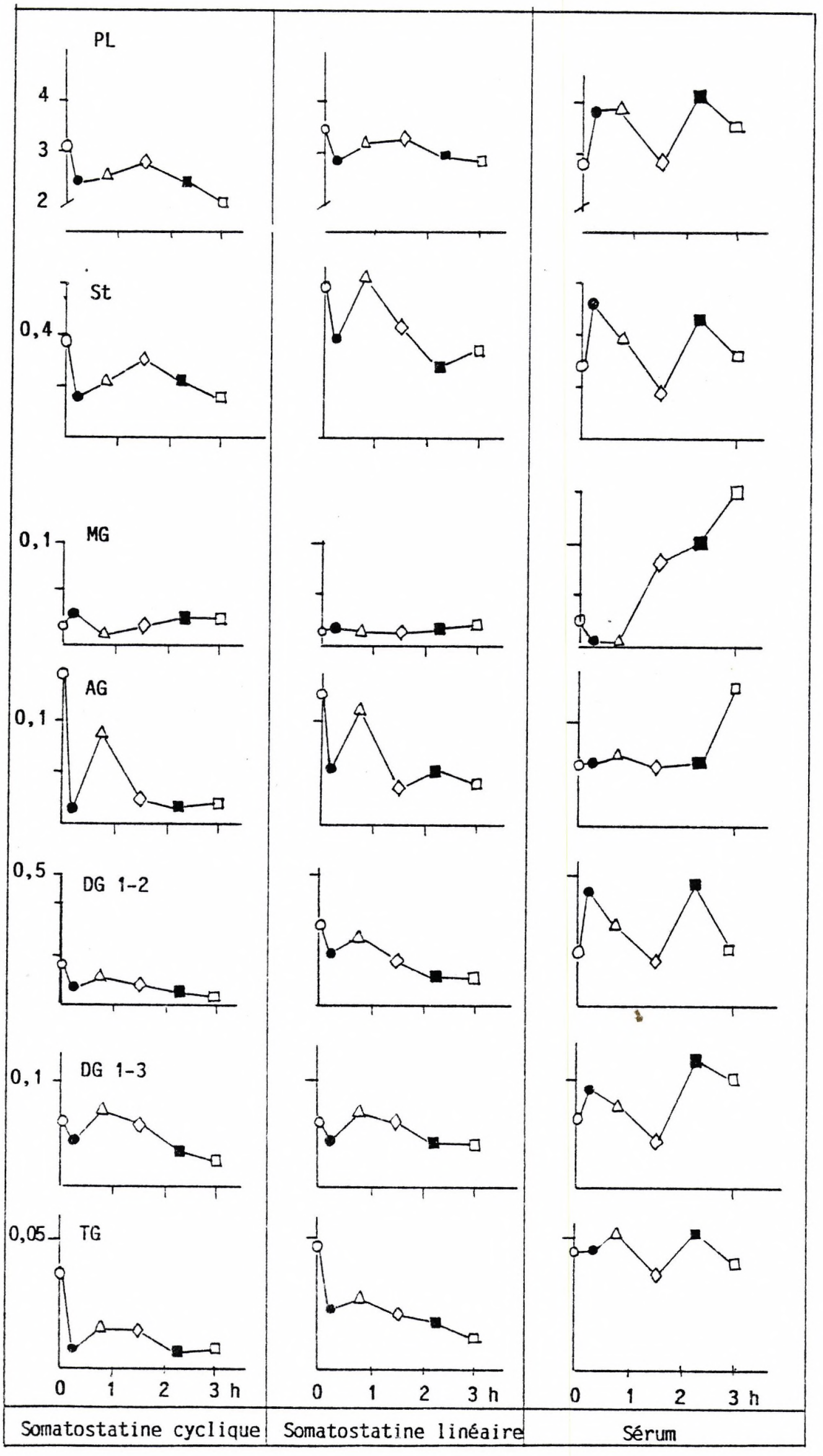

PL
4
3
2
St
0,4
MG
0,1
AG
0,1
DG 1-2
0,5
DG 1-3
0,1
TG
0,05
0 1 2 3 h
0 1 2 3 h
0 1 2 3 h
Somatostatine cyclique
Somatostatine linéaire
Sérum

Fig. 9

L'interprétation statistique des résultats est en cours, mais il apparaît d'ores et déjà certains traits caractéristiques.

Chez les individus recevant du sérum, les fractions St, DG 1-2 et DG 1-3 varient dans le même sens, ainsi, à quelques variantes près (moindre augmentation à 5-10 mn), que les phospholipides et les triglycérides. Les monoglycérides augmentent continuement dès 90 mn, tandis que les acides gras, invariants jusqu'à 135 mn, augmentent brutalement à 180 mn.

Les deux formes de somatostatine présentent des effets très concordants. Elles neutralisent totalement les variations des monoglycérides et réduisent l'amplitude des oscillations des phospholipides et des diglycérides. Le sens des variations de 0 à 10 mn est, en outre, constamment inversé par rapport à l'action du sérum.

Enfin, des analogies quant au sens des variations après injections subsistent entre les fractions St et DG (sauf pour la forme cyclique) et s'étendent, dans une certaine mesure, aux fractions TG et AG.

D'une façon générale, en présence de somatostatine, il se produit presque toujours une chute après 10 mn suivie d'une remontée à 45 mn. Lorsqu'une stabilisation des variations intervient, celle-ci ne se produit qu'à partir du niveau atteint à 10 mn.

Il peut être tiré de ces résultats la conclusion provisoire que l'action des formes cyclique et linéaire de la somatostatine se traduit par des effets analogues à concentrations égales (contrairement à ce qui se passe avec les glucides), mais que les résultats obtenus diffèrent d'une classe lipidique à l'autre. Une étude plus détaillée permettra de caractériser les relations entre classes lipidiques par leurs équations respectives.

IV - 3 - Effets anti-adrénergiques du propranolol sur la glycémie de l'abeille *in vivo*.

La figure 10 montre la réaction hyperglycémique de la noradrénaline injectée chez l'abeille à raison de 1 nmole par individu. Il

se confirme que le traumatisme provoqué par l'injection elle-même (cas du sérum) entraîne, surtout au niveau de la glucosémie, l'équivalent d'une faible décharge adrénergique. La corrélation, illustrée par la figure 13A, a pour paramètres : $\rho=0,993(P=7.10^{-5})$; $b=2,62$ ($\sigma_b=0,024$).

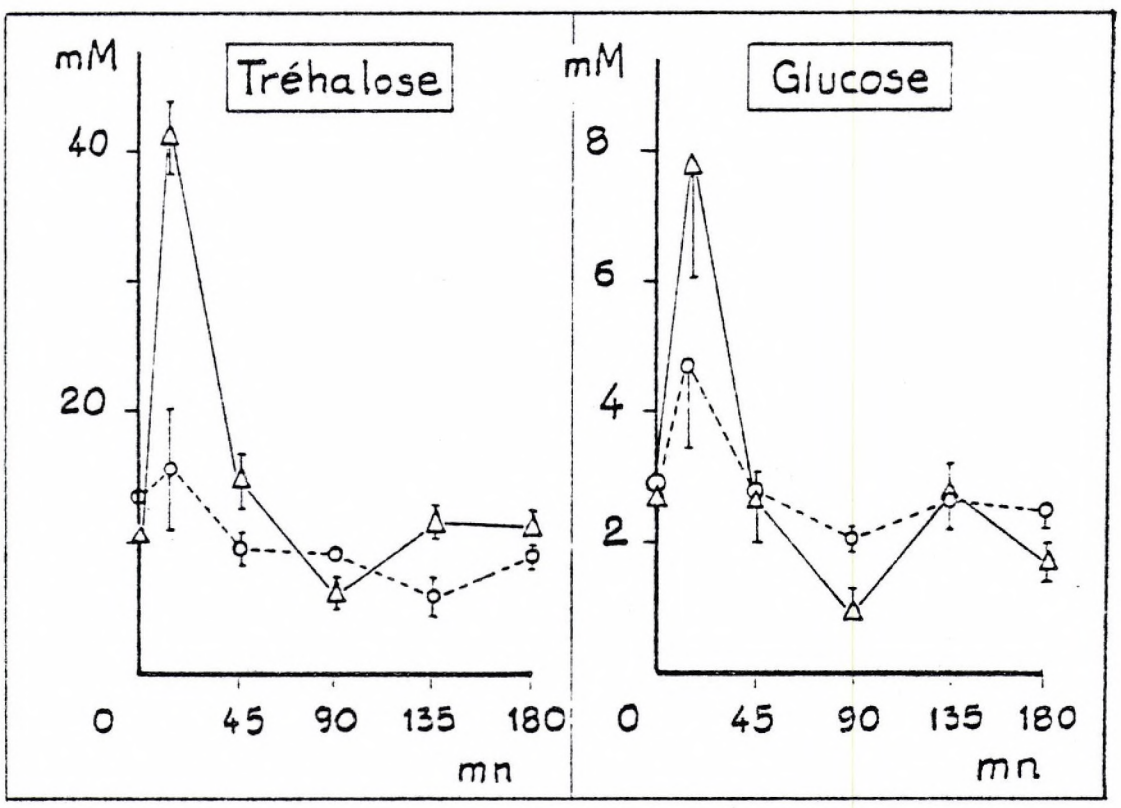


Fig. 10

La figure 11 illustre les résultats comparés de l'injection de noradrénaline seule ou en présence de propranolol (2,5 nmoles par individu).

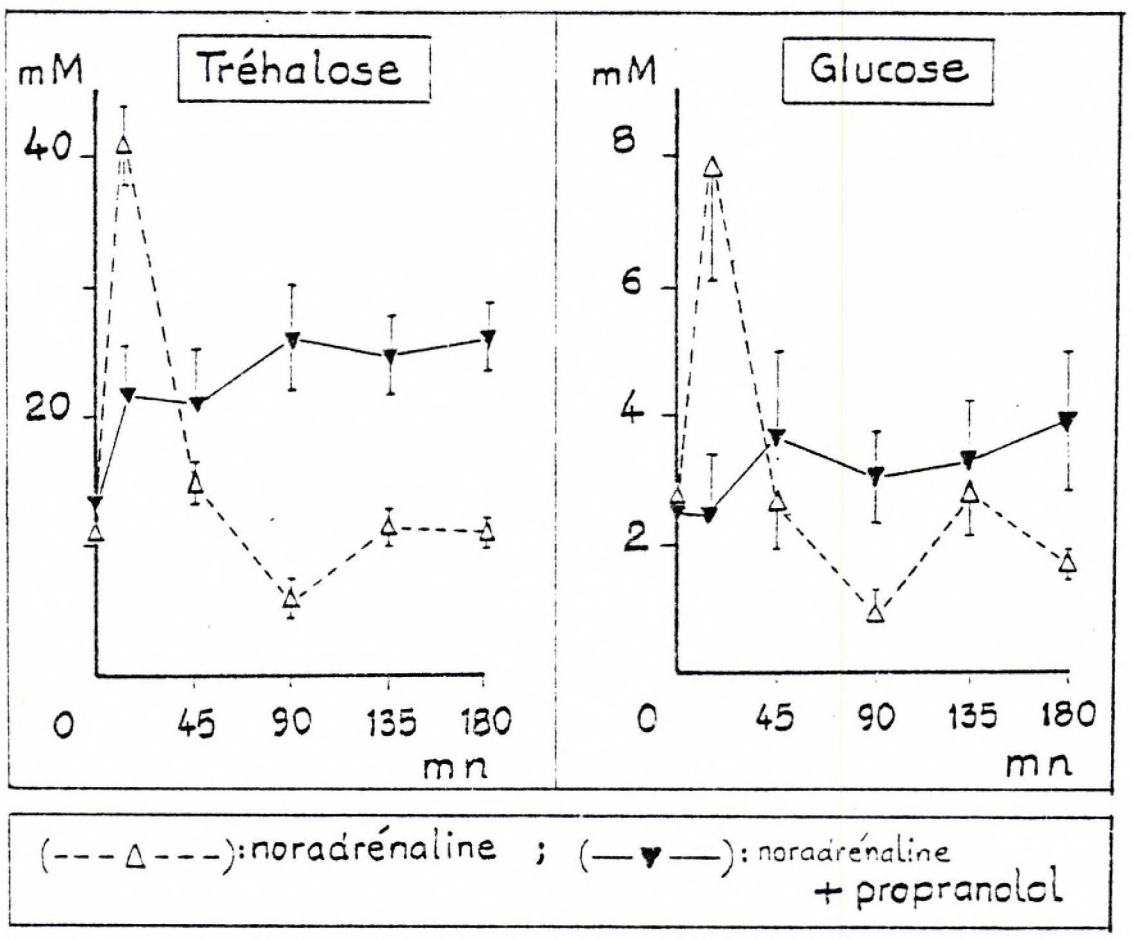


Fig. 11

Le propranolol bloque totalement l'hyperglucosémie et réduit considérablement l'hypertréhalosémie. Toutefois, les valeurs de la glycémie se stabilisent à un niveau supérieur à celui des témoins : ceci peut correspondre soit à une action secondaire de l'effecteur sur les récepteurs, soit à une hyperglycémie compensatrice provoquée par des facteurs non adrénergiques, tels que le glucagon.

L'injection de propranolol seul provoque des effets très voisins de ceux observés avec le mélange (propranolol + noradrénaline), (fig. 12), ce qui confirme les hypothèses précédentes : l'analogie d'effet est illustrée par la figure 13B. Les paramètres statistiques de corrélation entre les deux cas : ρ = 0,822 (P=0,04) ; b=0,998 (σ_b=0,34).

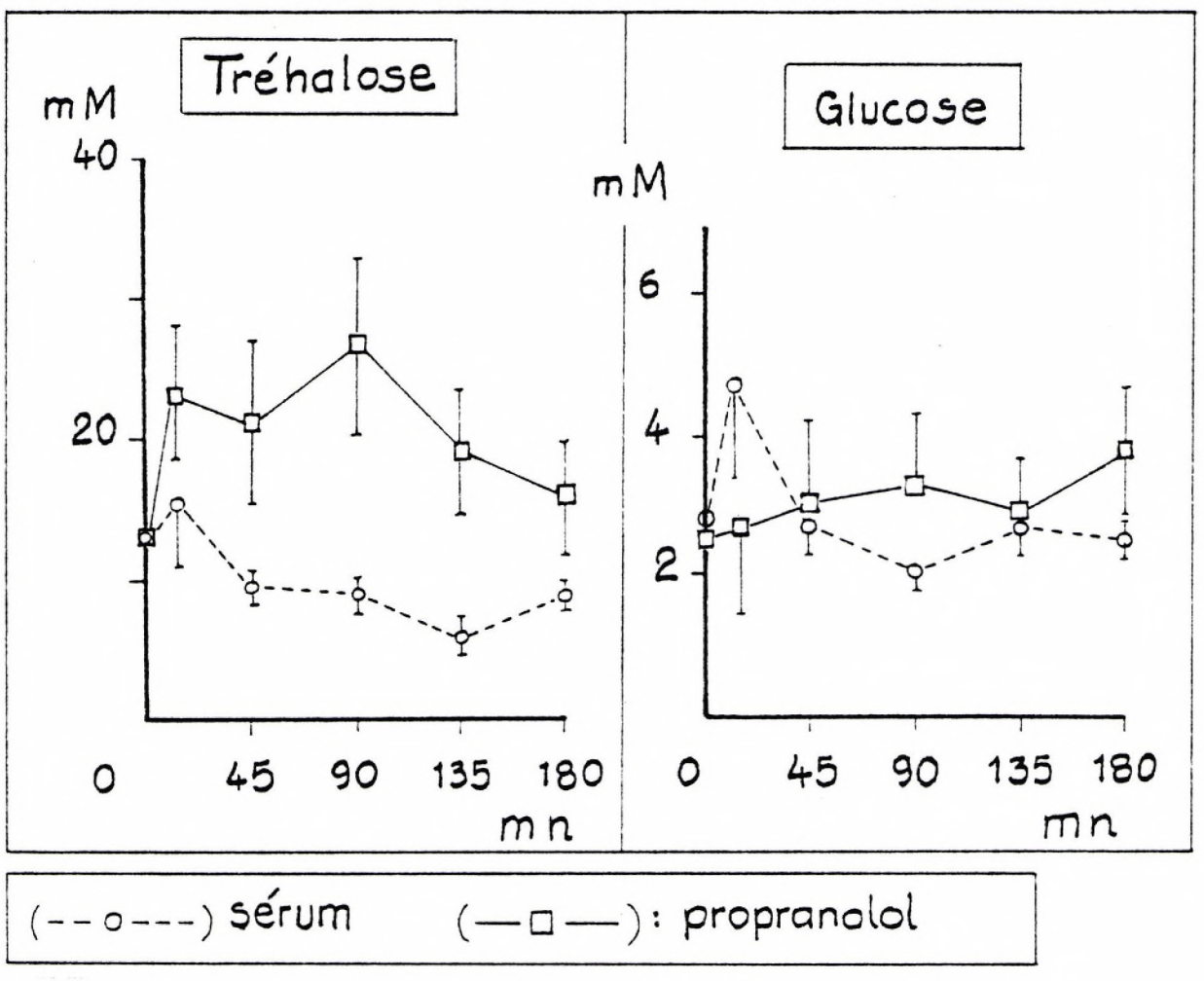


Fig. 12

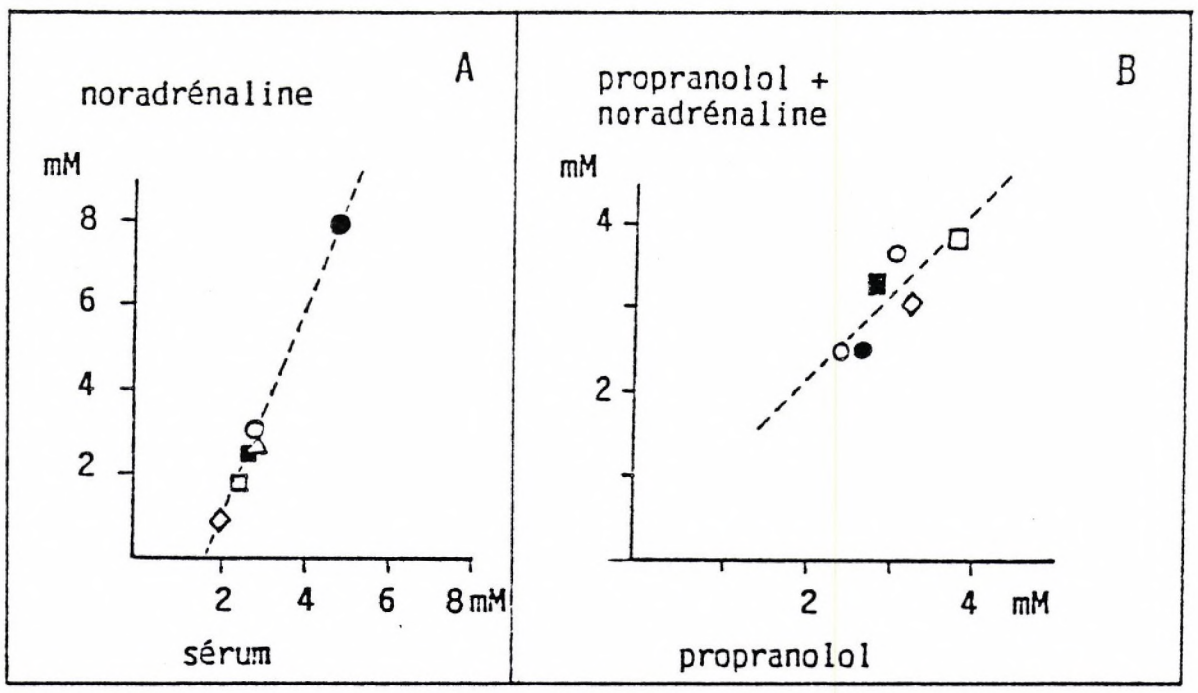


Fig. 13 - Corrélations dans les variations de la glucosémie de l' Abeille après injection : A) de noradrénaline ou de sérum. B) de propranolol pur ou en présence de noradrénaline. Les symboles suivants désignent les durées après injection: o = Témoins ; • = 10-15 mn ; Δ = 45 mn ; ◊ = 90 mn ; ■ = 135 mn ; □ = 180 mn.

L'ensemble des résultats numériques est rassemblé dans les tableaux 11 et 12.

Tableau I

Variations de la tréhalosémie (mM) de l'abeille après injection de sérum, de noradrénaline, de propranolol, et du mélange des deux effecteurs. Les écarts types sont indiqués entre parenthèses d'après N=3 mesures.

temps	sérum	noradrénaline	noradrénaline + propranolol	propranolol
0	13,76(1,34)	10,83(2,59)	13,28(1,41)	13,28(1,41)
10-15	15,45(1,99)	41,09(1,04)	23,58(1,77)	23,26(2,00)
45	9,53(0,17)	14,84(0,82)	20,92(1,91)	21,20(2,42)
90	8,97(0,15)	5,96(0,13)	25,68(1,93)	27,10(2,75)
135	5,79(0,53)	11,40(0,46)	24,82(1,31)	18,93(1,85)
180	8,70(0,29)	11,09(0,35)	26,72(1,17)	15,98(1,56)
Moyennes générales	10,37	15,86	22,50	19,96
Variances	12,74	160,71	24,39	24,98

Tableau II

Variations de la glucosémie (mM) de l'abeille après injection de sérum, de noradrénaline, de propranolol, et du mélange des deux effecteurs. Les écarts types sont indiqués entre parenthèses d'après N=3 mesures.

temps (mn)	sérum	noradrénaline	noradrénaline + propranolol	propranolol
0	2,89(0,13)	2,70(0,30)	2,47(0,57)	2,47(0,57)
10-15	4,74(0,51)	7,87(0,68)	2,45(0,39)	2,65(0,52)
45	2,76(0,13)	2,63(0,27)	3,68(0,50)	3,07(0,50)
90	2,03(0,03)	0,85(0,14)	3,00(0,31)	3,24(0,42)
135	2,64(0,12)	2,68(0,22)	3,22(0,41)	2,85(0,35)
180	2,55(0,12)	1,67(0,09)	3,83(0,46)	3,82(0,38)
Moyennes générales	2,935	3,063	3,108	3,016
Variances	0,870	6,093	0,340	0,232

L'analyse statistique des données numériques permet de confirmer l'identité d'action du propranolol seul ou en mélange avec la noradrénaline ($P \geqslant 0,34$) et de distinguer la réponse à l'injection de noradrénaline seule, d'une part de celle du sérum ($P < 0,03$) et d'autre part de celles obtenues avec le propranolol ($P \leqslant 0,03$).

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication le 9 Novembre 84 devant les Sociétés de Biochimie et de Biologie réunies à Montpellier.

IV - 4 - Interaction de la somatostatine avec les effets de l'insuline d'abeille sur les relations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeille. (M. BOUNIAS, M. MOREAU[1] et L. GOURDOUX[1].

(1) Université de Bordeaux : Laboratoire de Physiologie Animale : Métabolisme.

Ce chapitre regroupe plusieurs séries d'expériences (dont le dépouillement est pratiquement achevé) effectuées avec la collaboration des DRS. R. MOREAU et L. GOURDOUX, qui ont fourni les préparations d'"insuline" isolée et purifiée à partir d'abeilles.

L'ensemble des travaux a eu pour but d'une part d'analyser l'action d'une insuline d'origine endogène sur la glycémie et la lipémie de l'abeille, (par injections in vivo) et d'autre part, d'éprouver l'inter action de la somatostatine de Vertébrés avec les effets de cette préparation hormonale.

Les traitements appliqués sont désignés de la façon suivante :
(I) : sérum seul
(II) : sérum + insuline d'abeille
(III) : sérum + insuline d'abeille + somatostatine de Vertébrés.

L'ensemble des résultats numériques concernant les glucides, présenté dans le tableau 13, a fait l'objet d'une communication à la Société de Biologie le 4 Juillet 1984.

Tableau 13 - Variations de la tréhalosémie (Tre) et de la glucosémie (Glc) de l'abeille après injection de sérum [I], d'insuline endospécifique [II] et du mélange d'insuline et de somatostatine [III]. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types (s), exprimés en mM sont calculés d'après (N) mesures.

	(I)		(II)		(III)	
	Tre	Glc	Tre	Glc	Tre	Glc
	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N) s
Controls	23.7(3) 6.1 [1.00]	3.29(3)0.33 [1.00]	27.9 (3)1.9 [1.00]	3.60(3)0.30 [1.00]	27.5(5)7.4 [1.00]	3.30(6)0.60 [1.00]
10 min	26.0(3)10.6 [1.09]	3.88(3)0.67 [1.18]	16.8 (4)2.7 [0.60]	2.96(4)0.78 [0.82]	24.0(3)1.4 [0.87]	4.41(3)0.40 [1.34]
45 min	21.2(3) 1.5 [0.89]	3.37(3)0.67 [1.02]	12.5 (4)1.1 [0.45]	3.01(6)2.58 [0.84]	22.8(3)2.3 [0.83]	4.08(3)0.28 [1.24]
1 h 30	18.7(3) 2.7 [0.79]	2.44(3)0.44 [0.74]	22.9 (4)3.9 [0.82]	3.06(4)0.54 [0.85]	15.3(3)1.8 [0.56]	2.96(3)0.08 [0.90]
2 h 15	28.1(3) 6.6 [1.18]	6.45(3)1.7 [1.96]	11.2 (4)0.7 [0.40]	3.19(6)0.61 [0.89]	31.5(3)3.8 [1.14]	5.82(3)0.40 [1.76]
3 h	22.7(3) 7.0 [0.96]	4.38(3)1.98 [1.33]	7.54(4)1.15 [0.27]	2.47(4)0.23 [0.69]	21.0(3)2.0 [0.76]	3.79(3)0.25 [1.15]
Average after treatment	23.3(5) 3.3	4.10(5)1.34	14.2 (5)5.3	2.94(5)0.25	22.9(5)5.2	4.21(5)0.94
	comparison with (I)		P < 0.01	P < 0.05	not significant	

Average values of controls (mM) : Tre = 26.36(3)1.89 ; Glc = 3.40(3)0.14

Les résultats obtenus avec 3 doses différentes d'insuline sont présentés sur les figures 14 et 15, par comparaison avec l'action du sérum (fig. 16).

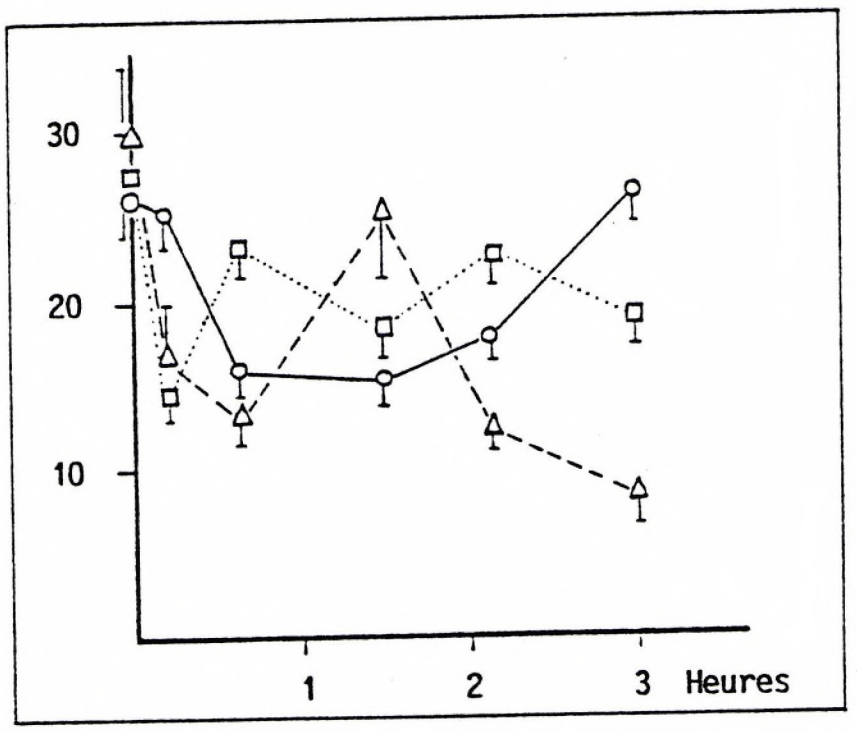


Fig. 14 - Variations de la tréhalosémie de l'abeille après injection de 3 doses différentes d'insuline d'origine endogène : (o)=0,1 µU par individu (N=3) ; (Δ)=0,5 µU par individu (N=4) ; (□)=2,5 µU par individu (N=3). Les écarts-types sont indiqués pour (N) mesures.

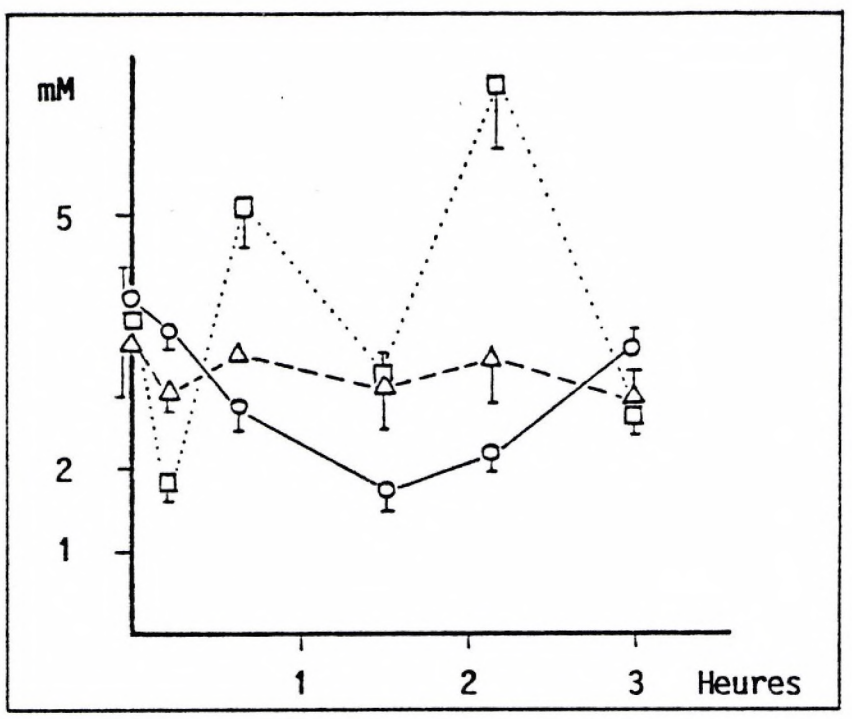


Fig. 15 - Variations de la glucosémie de l'abeille après injection de 3 doses différentes d'insuline d'origine endogène : (o)=0,1 µU par individu (N=3) ; (Δ)=0,5 µU par individu (N=4) ; (□)=2,5 µU par individu (N=3). Les écarts-types sont indiqués pour (N) mesures.

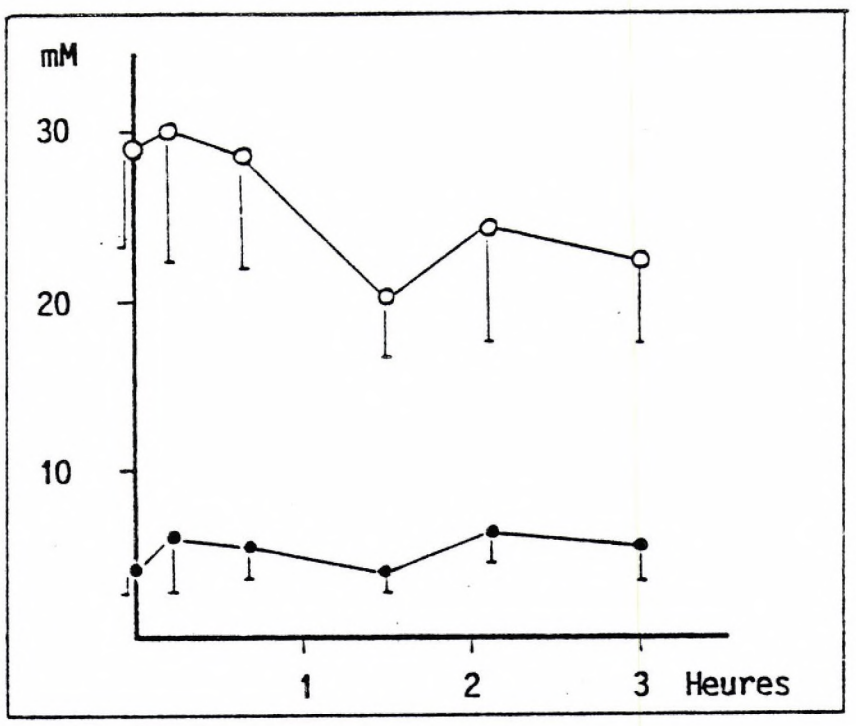


Fig. 16 - Variations de la tréhalosémie (-o-) et de la glucosémie (-•-) après injection de sérum. Les intervalles de confiance sont indiqués pour N=mesures indépendantes.

Il apparaît ainsi une série de relations de type doses/effets (les doses [d] étant figurées en coordonnées inverses) affectant non seulement les concentrations, mais également le temps de latence (LT) qui précède l'apparition d'une hyperglycémie compensatrice (fig. 17).

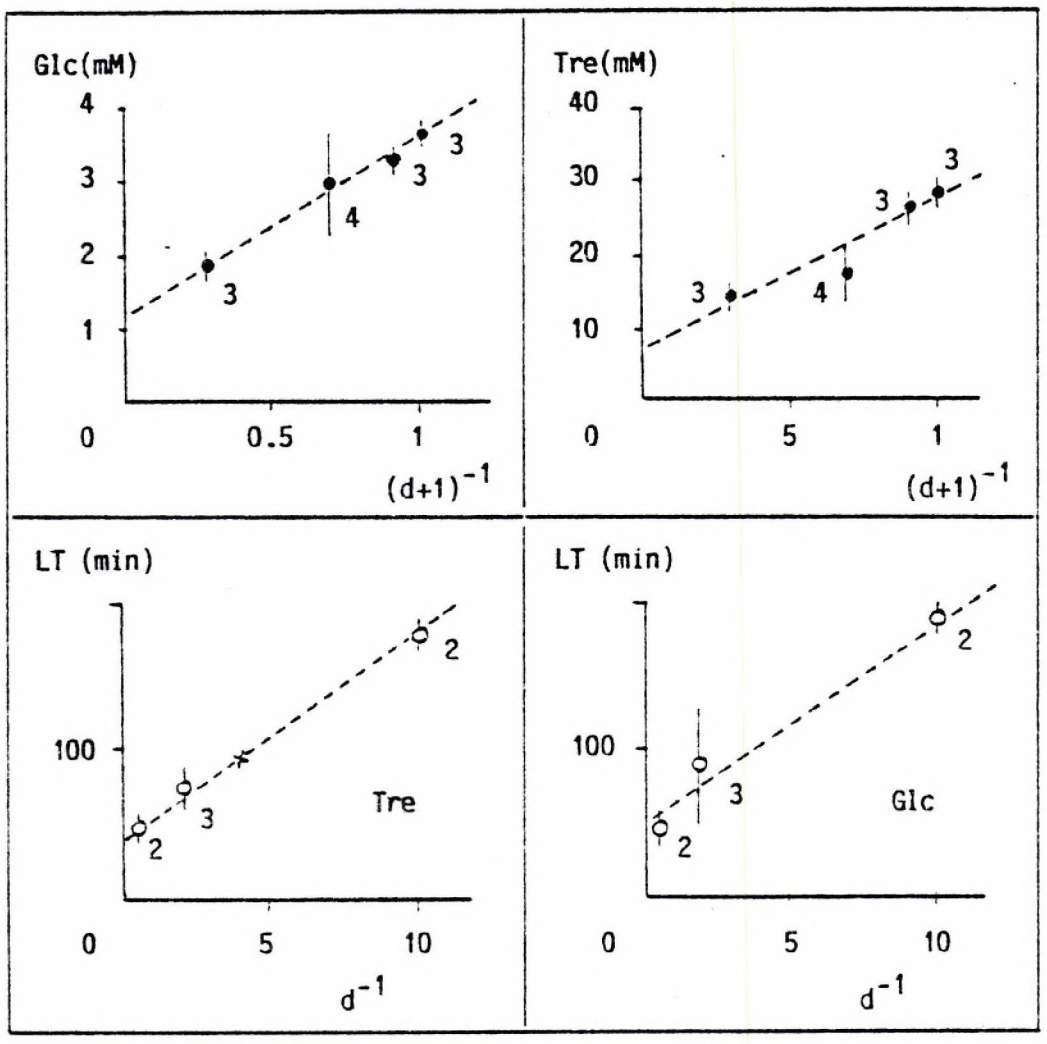


Fig. 17

Enfin, la figure 18 témoigne de la neutralisation, par la somatostatine, des effets obtenus par l'injection d'insuline endogène au niveau de la glucosémie.

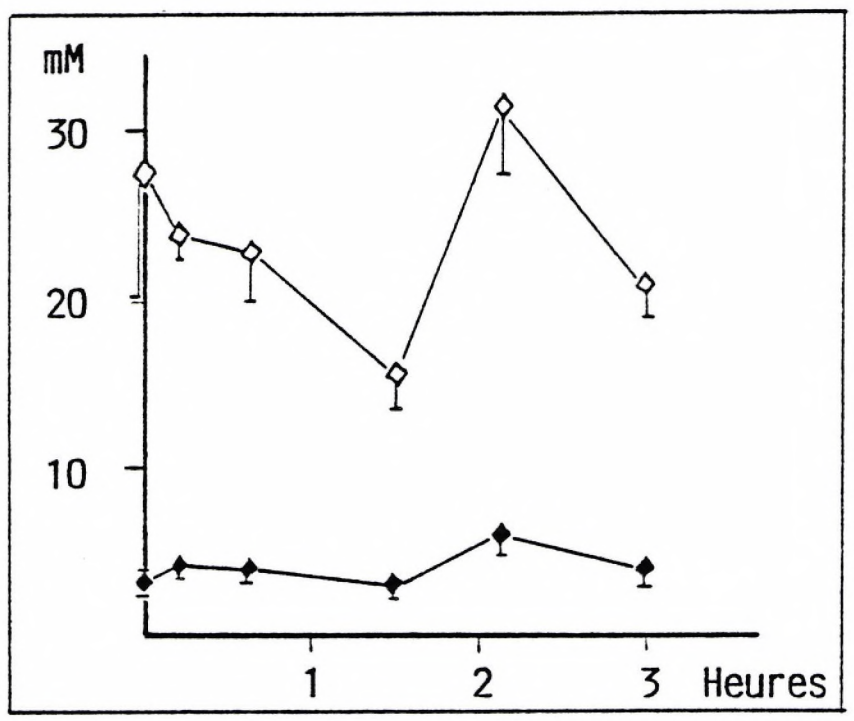


Fig. 18 - Variations de la tréhalosémie (-◊-) et de la glucosémie (-♦-) de l'abeille après injection simultanée d'insuline d'origine endogène et de somatostatine. Les écarts-types sont indiqués pour (N)=3 mesures.

L'analyse des corrélations entre la tréhalosémie et la glucosémie est illustrée par la figure 19 : les paramètres statistiques se présentent comme suit :

traitement (I) : ρ=0,837(P=0,037) ; b=0,34(σ_b=0,11)
(II) : ρ=0,781(P=0,07) ; b=0,036(σ_b=0,011)
(III) : ρ=0,747(P=0,08) ; b=0,14(σ_b=0,06)

La somatostatine rétablit ainsi partiellement (≃ 50%) la pente de la relation, abaissée d'un facteur 10 par l'insuline.

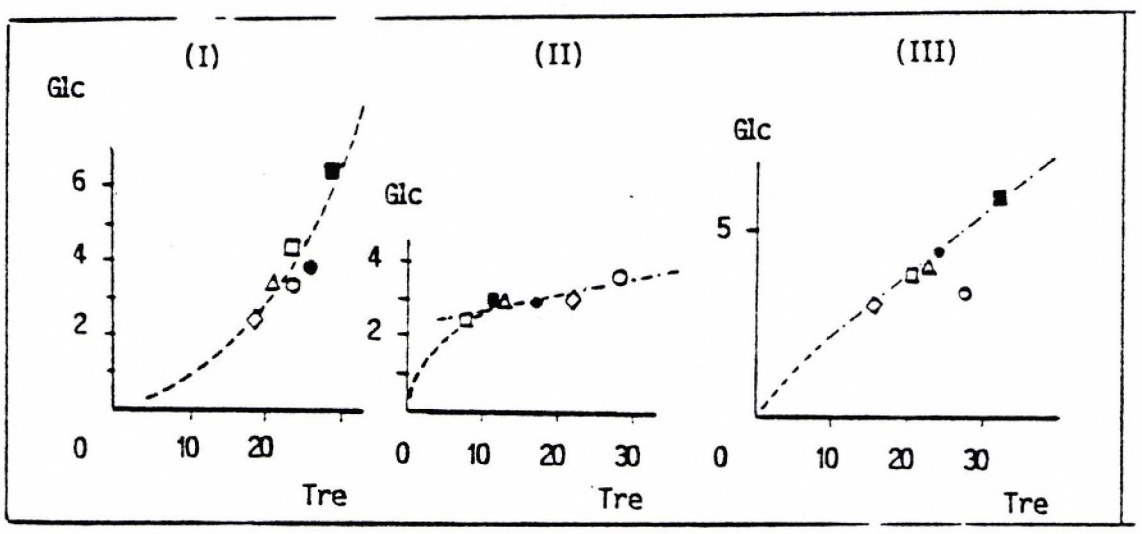


Fig. 19 - Relations intra-glycémiques : o=témoins ; o=10 mn ; Δ=45 mn ; ◊=90 mn ; =135 mn ; =180 mn.

Les tableaux 14, 15, 16 et 17 présentent les principaux résultats numériques obtenus avec les lipides.

Tableau 14 - Variations des concentrations d'acides gras non estérifiés dans l'hémolymphe d'abeille, après injection de sérum [I], d'insuline endospécifique [II] et du mélange d'insuline et de somatostatine [III]. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types exprimés en mM sont calculés d'après (N) mesures.

	(I) $\bar{x}$ (N) s	(II) $\bar{x}$ (N) s	(III) $\bar{x}$ (N) s
controls	0.060(4)0.016 [1.00]	0.032(2)0.013 [1.00]	0.081(3)0.050 [1.00]
10 min	0.059(4)0.005 [0.98]	0.049(2)0.020 [1.53]	0.129(2)0.045 [1.59]
45 min	0.061(4)0.015 [1.02]	0.067(4)0.015 [2.09]	0.119(2)0.041 [1.47]
1 h 30	0.033(4)0.007 [0.55]	0.050(2)0.019 [1.56]	0.104(2)0.036 [1.28]
2 h 15	0.040(4)0.016 [0.67]	0.045(4)0.033 [1.41]	0.125(2)0.044 [1.54]
3 h	0.134(4)0.068 [2.23]	0.064(2)0.024 [2.00]	0.150(2)0.051 [1.85]
Average (treatment)	0.065(4)0.036 [1.08]	0.055(5)0.009 [1.72]	0.125(5)0.015 [1.54]
Average value of controls : 0.058(3)0.020			

Tableau 15 - Variations des concentrations de diacyl 1-2 et diacyl 1-3 glycérols dans l'hémolymphe d'abeille après injection de sérum [I], d'insuline endospécifique [II] et du mélange d'insuline et de somatostatine [III]. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types (s), exprimés en mM sont calculés d'après (N) mesures.

	(I)		(II)		(III)	
	$\bar{x}$ (N) s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s
Controls	0.10(6)0.01 [1.00]	0.046(6)0.018 [1.00]	0.075(4)0.006 [1.00]	0.033(3)0.011 [1.00]	0.118(3)0.045 [1.00]	0.059(3)0.021 [1.00]
10 min	0.17(6)0.04 [1.7]	0.049(6)0.008 [1.06]	0.042(4)0.004 [0.56]	0.009(2)0.004 [0.27]	0.080(3)0.013 [0.68]	0.020(3)0.010 [0.34]
45 min	0.12(6)0.03 [1.2]	0.044(6)0.007 [0.96]	0.055(4)0.015 [0.73]	0.019(4)0.013 [0.57]	0.061(3)0.006 [0.52]	0.018(3)0.009 [0.30]
1 h 30	0.09(6)0.02 [0.9]	0.039(6)0.006 [0.85]	0.090(4)0.011 [1.2]	0.025(4)0.006 [0.76]	0.034(3)0.004 [0.29]	0.008(3)0.004 [0.13]
2 h 15	0.19(6)0.06 [1.9]	0.065(6)0.010 [1.41]	0.040(4)0.012 [0.53]	0.032(4)0.013 [0.10]	0.141(3)0.015 [1.19]	0.020(3)0.009 [0.34]
3 h	0.11(6)0.03 [1.1]	0.064(6)0.010 [1.39]	0.054(4)0.019 [0.72]	0.018(4)0.005 [0.54]	0.065(3)0.008 [0.55]	0.017(3)0.008 [0.29]
Average (treatment)	0.14(5)0.04 [1.40]	0.052(6)0.010 [1.13]	0.056(5)0.018 [0.75]	0.021(5)0.008 [0.64]	0.076(5)0.036 [0.64]	0.017(5)0.004 [0.29]
Average values of controls (mM) DG 1-2 = 0.098(3)0.018 : DG 1-3 = 0.046(3)0.011.						

Tableau 16 - Variations des concentrations de phospholipides et de stéroïdes dans l'hémolymphe d'abeille après injection de sérum [I], d'insuline endospécifique [II] et du mélange d'insuline et de somatostatine [III]. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types (s), exprimés en mM sont calculés d'après (N) mesures.

	(I)		(II)		(III)	
	PL $\bar{x}$ (N) s	St $\bar{x}$ (N)/s	PL $\bar{x}$ (N)/s	St $\bar{x}$ (N)/s	PL $\bar{x}$ (N)/s	St $\bar{x}$ (N)/s
controls	2.73(6)0.72 [1.00]	0.18(6)0.02 [1.00]	3.84(4)0.77 [1.00]	0.21(4)0.03 [1.00]	3.60(3)0.63 [1.00]	0.22(3)0.04 [1.00]
10 min	2.64(6)0.59 [0.96]	0.23(6)0.03 [1.30]	2.27(4)0.59 [0.59]	0.30(4)0.06 [1.43]	3.71(3)0.78 [1.03]	0.12(4)0.02 [0.54]
45 min	2.41(6)0.47 [0.88]	0.19(6)0.03 [1.05]	3.11(4)0.36 [0.81]	0.20(4)0.04 [0.95]	3.64(3)0.73 [1.01]	0.09(4)0.02 [0.40]
1 h 30	2.43(6)0.48 [0.89]	0.11(6)0.02 [0.61]	3.32(4)0.53 [0.86]	0.22(4)0.04 [1.05]	2.58(3)0.46 [0.72]	0.06(4)0.02 [0.27]
2 h 15	3.42(6)0.80 [1.25]	0.23(6)0.03 [1.28]	2.55(4)0.34 [0.66]	0.12(4)0.04 [0.57]	5.75(3)1.51 [1.59]	0.18(4)0.03 [0.82]
3 h	3.32(6)0.55 [1.22]	0.18(6)0.03 [1.00]	2.93(4)0.43 [0.76]	0.15(4)0.02 [0.71]	3.90(3)0.80 [1.08]	0.11(4)0.02 [0.50]
Average (treatment	2.84(5)0.44 [1.04]	0.19(5)0.04 [1.05]	2.84(5)0.38 [0.74]	0.20(5)0.06 [0.95]	3.92(5)1.02 [1.09]	0.11(5)0.04 [0.50]

Average values of controls (mM) : PL = 3.39(3)0.47 ; St = 0.20(3)0.02

Tableau 17 - Variations des concentrations de triglycérides chaînes courtes (TGs : < C18) et longues (TG > C18) dans l'hémolymphe d'abeilles après injection de sérum [I], d'insuline endospécifique [II] et du mélange d'insuline et de somatostatine [III]. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types (s), exprimés en mM sont calculés d'après (N) mesures.

	(I)		(II)		(III)	
	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s	$\bar{x}$ (N)/s
controls	0.073(5)0.006 [1.00]	0.032(5)0.008 [1.00]	0.083(4)0.010 [1.00]	0.037(3)0.005 [1.00]	0.069(3)0.013 [1.00]	0.021(2)0.011 [1.00]
10 min	0.075(5)0.011 [1.03]	0.036(5)0.009 [1.12]	0.088(4)0.038 [1.06]	0.046(2)0.00 [1.24]	0.060* [0.87]	0.008* [0.38]
45 min	0.064(5)0.008 [0.88]	0.041(5)0.018 [1.28]	0.084(4)0.043 [1.01]	0.095(2)0.005 [2.56]	0.057* [0.83]	0.022* [1.05]
1 h 30	0.062(5)0.008 [0.85]	0.062(5)0.048 [1.93]	0.123(4)0.059 [1.48]	0.132(4)0.048 [3.57]	0.060* [0.87]	0.010* [0.45]
2 h 15	0.075(5)0.007 [1.03]	0.030(5)0.023 [0.94]	0.042(4)0.013 [0.50]	0.094(4)0.011 [2.54]	0.066* [0.96]	0.009* [0.43]
3 h	0.072(5)0.006 [0.99]	0.027(5)0.014 [0.84]	0.050(3)0.005 [0.60]	0.079(4)0.069 [2.13]	0.054* [0.78]	0.011* [0.52]
Average (treatment)	0.070(5)0.005 [0.96]	0.039(5)0.012]1.22]	0.077(5)0.029 [0.93]	0.089(5)0.028 [2.40]	0.059(5)0.0024 [0.85]	0.012(5)0.005 [0.57]

Average values of controls (mM) : TG_S = 0.075(3)0.006 ; TG_L = 0.030(3)0.007

* The limited number of data, due to the difficulties of nano-determinations did not allow the S.D. to be calculated. The coefficients of variation can be estimated CV=14±10% for TG_S and CV=28±12% for TG_L.

Comme dans le cas des glucides, ces résultats permettent de mettre en évidence certaines relations fonctionnelles entre classes de lipides, ainsi que des analogies ou des divergences entre traitements (I), (II) et (III). Les figures 20 à 25 illustrent les corrélations obtenues, dont les paramètres statistiques sont indiqués dans le tableau 18.

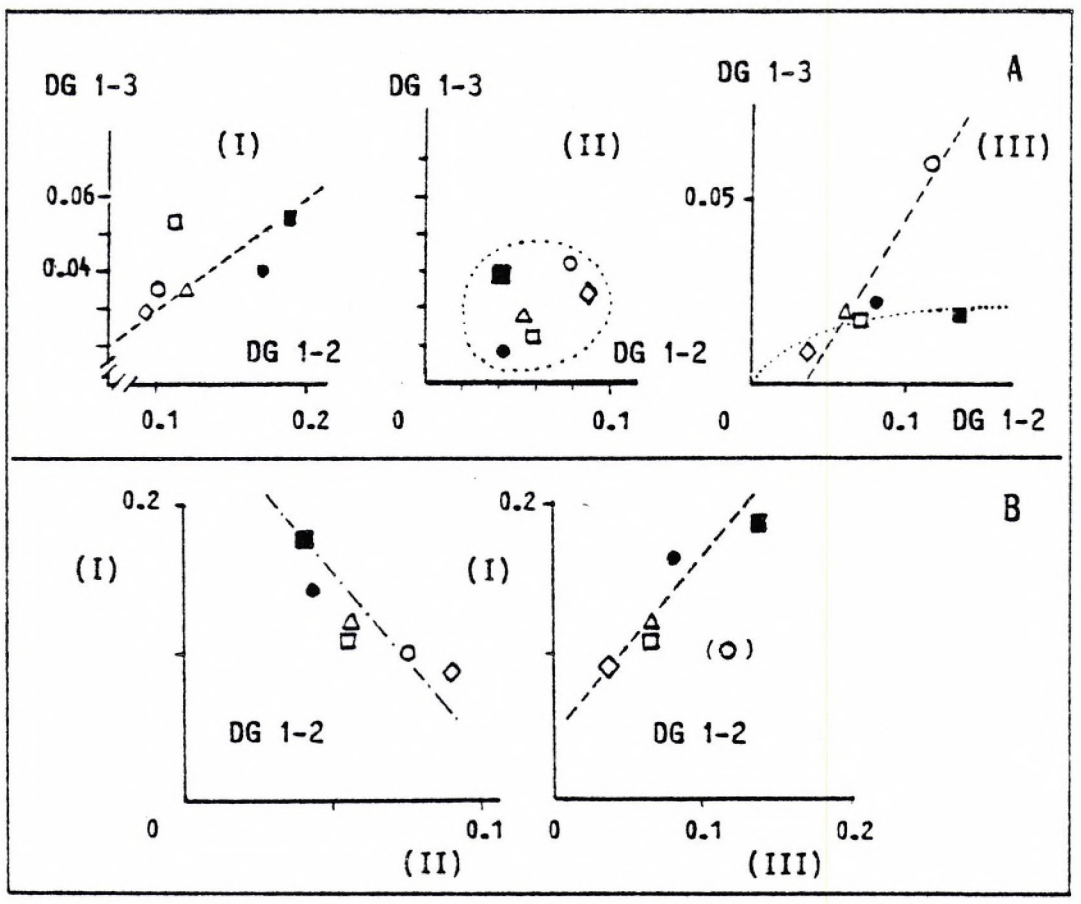


Fig. 20A - Relations fonctionnelles entre DG 1-2 et 1-3 et B - opposition de phase entre les traitements [I] (ou [III]) et [II]. o=témoins ; o=10 mn ; Δ=45 mn ; ◊=90 mn ; =135 mn ; =180 mn.

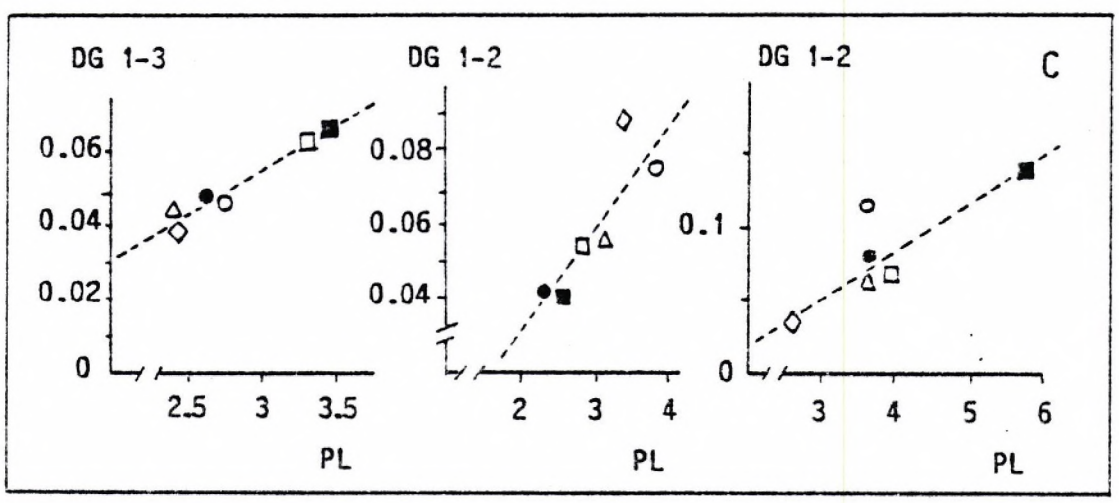


Fig. 20C - Relations fonctionnelles entre DG 1-3 et PL

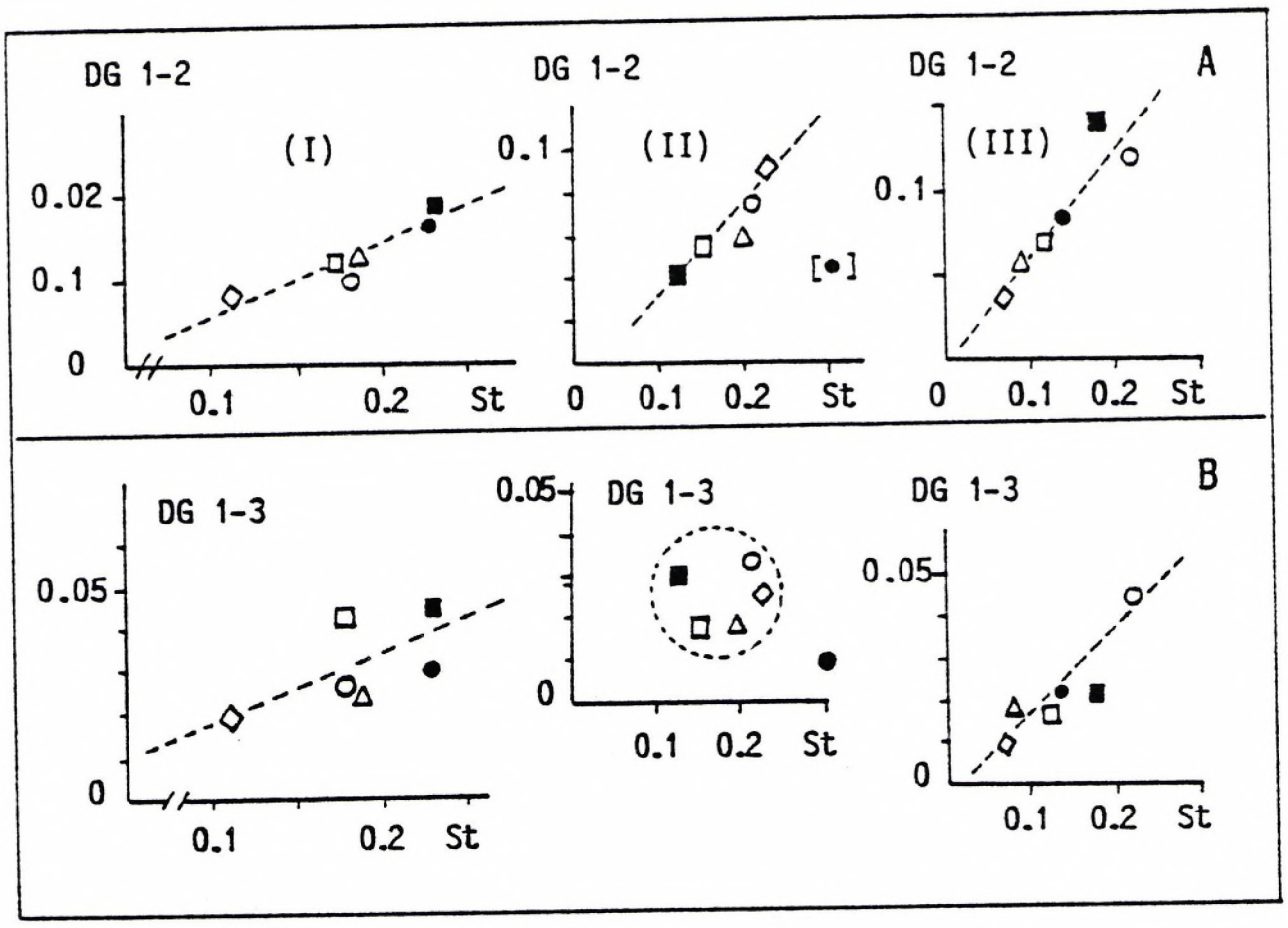


Fig. 21 - Relations fonctionnelles entre les stéroïdes et les DG 1-2 (A) et 1-3 (B).

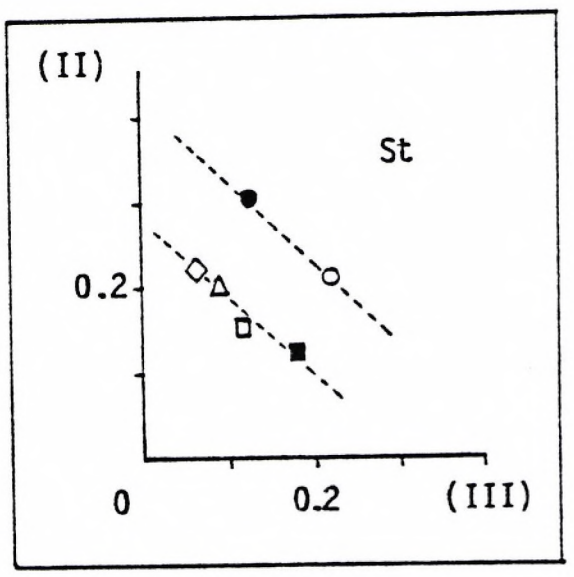


Fig. 22 - Opposition de phase des variations des stéroïdes entre l'action des traitements [II] (insuline) et [III] (insuline + somatostatine).

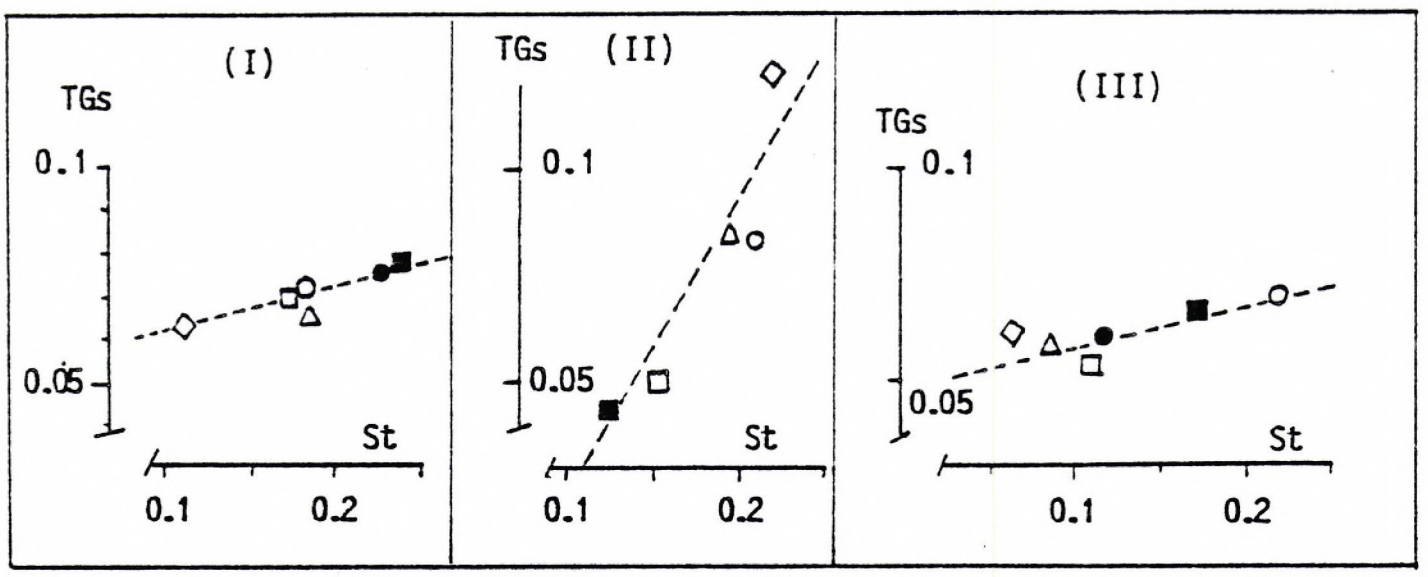


Fig. 23 - Relations entre les triglycérides courts (TGs) et les stéroïdes.

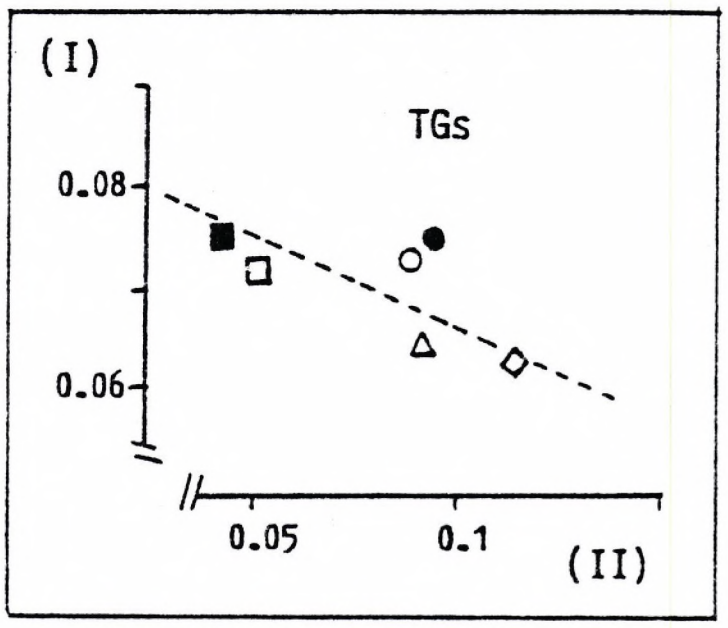


Fig. 24 - Opposition de phase des variations des TG courts entre l'action de l'injection de sérum [I] et d'insuline endospécifique [II].

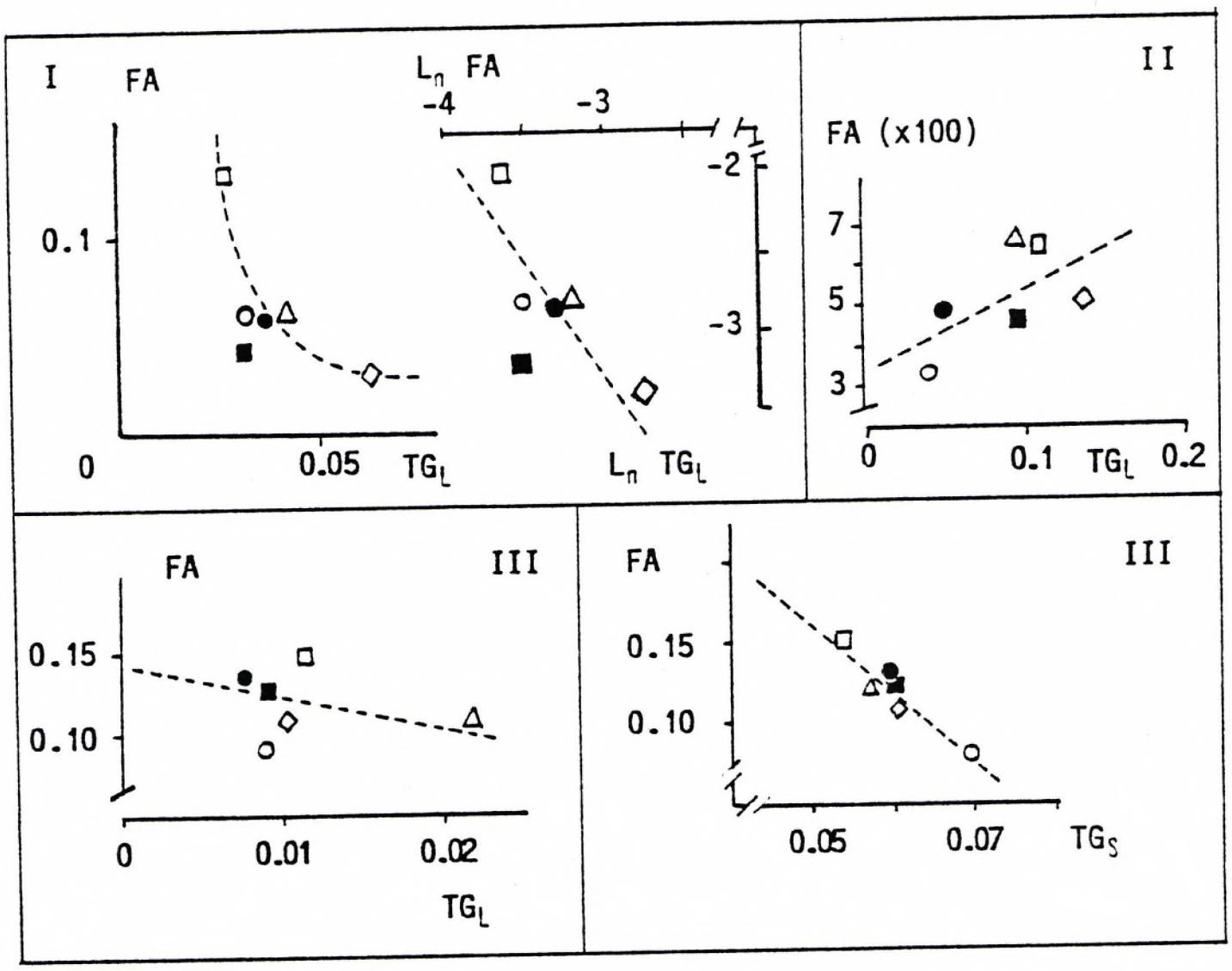


Fig. 25 - Relations entre acides gras et triglycérides courts (TGs) et longs (TGL)

Tableau 18 - Corrélations entre classes lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles soumises aux traitements suivants (injections in vivo)

(I) sérum
(II) sérum + insuline
(III) sérum + insuline + somatostatine

Composés en corrélations	Tr.	$\rho_{(N=6)}$	P(ρ)	b	σ_b
DG 1-3/PL	I	0,974	0,001	0,024	0,0023
	II	0,590	0,22	0,010	0,0056
	III	0,155	0,77		
DG 1-2/PL	I	-	-	-	-
	II	0,811	0,05	0,024	0,0071
	III	0,821	0,04	0,031	0,0088
DG 1-2/St	I	0,877	0,02	0,81	0,18
	II	0,14	0,79	-	
	III	0,897	0,015	0,61	0,12
DG 1-3/St	I	0,609	0,20	0,15	0,079
	II	-0,61	0,061	-0,09	0,048
	III	0,891	0,02	0,18	0,037
DG 1-3/DG 1-2	I	0,798	0,05	0,23	0,071
	II	0,403	0,43	-	
	III	0,580	0,22	0,26	0,14
DG 1-3/TGs	I	0,676	0,14	1,28	0,57
	II				
	III	0,794	0,06	1,90	0,593
TGs/PL	I	0,668	0,15	0,009	0,0041
DG 1-2/TGs	II	0,736	0,09	0,486	0,18
TGs/St	I	0,812	0,05	0,10	0,029
(*) pt. 10mn exclus	II*	0,930	0,02	1,40	0,23
(N=5)	III	0,882	0,04	0,095	0,021
TG_L/AG	I	-0,57	0,23	-	-
Bilog.	I	-0,686	0,13	-1,08	0,47
	II	0,553	0,25	0,195	0,12
	III	-0,642	0,17	-1,98	0,96
TGs/AG	III	-0,895	0,016	-4,2	0,85

De l'ensemble de ces données il est possible de dégager une série de relations entre glucides et lipides, illustrées par la fig. 26, et dont les paramètres statistiques sont indiqués dans le tableau 19.

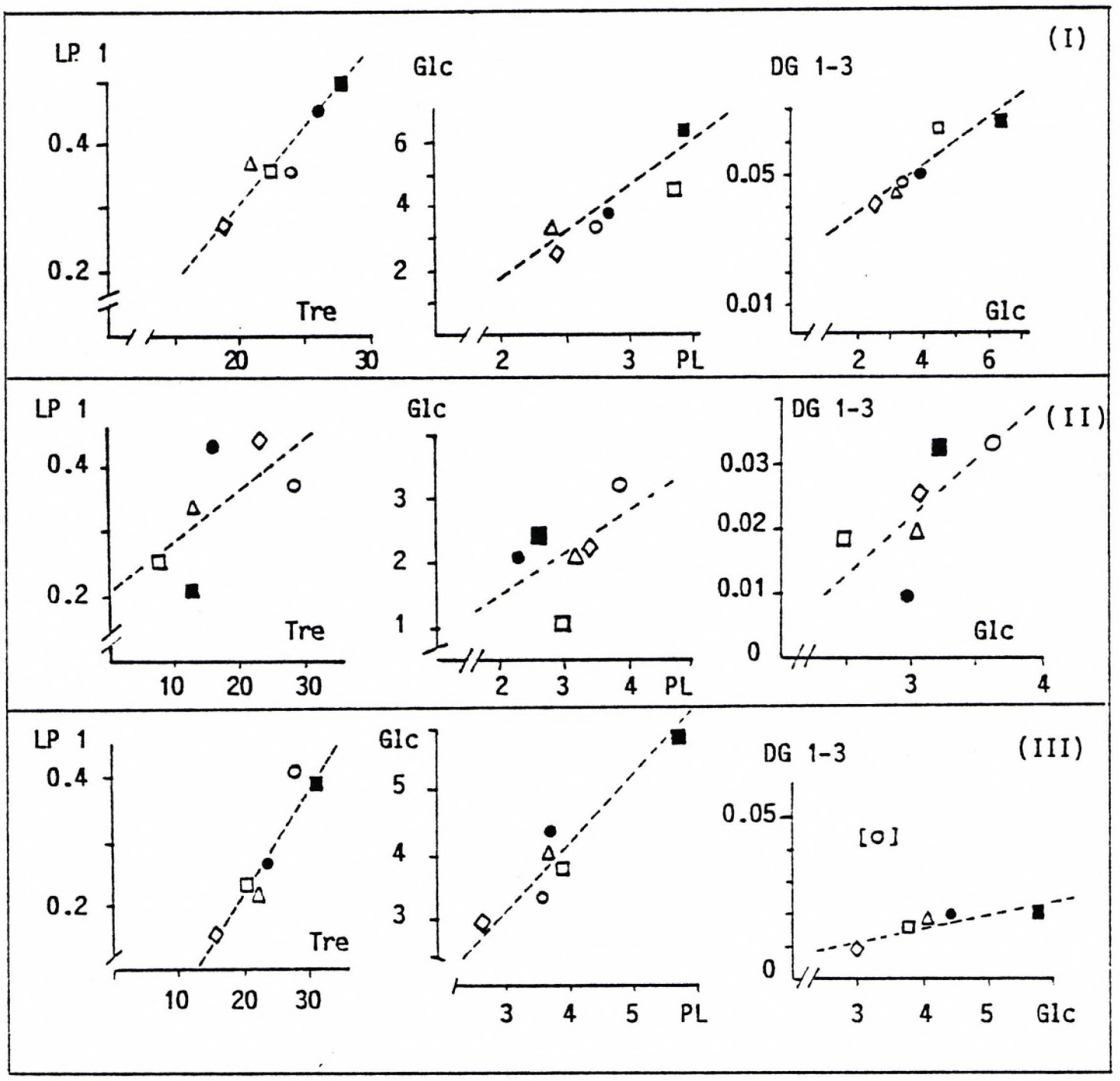


Fig. 26 - Relations glucido-lipidiques. o=témoins ; •=10 mn ; Δ=45 mn ; ◊=90 mn ; =135 mn ; =180 mn.

Tableau 19 - Corrélations glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'abeilles soumises aux traitements suivants (injections in vivo)

(I) sérum
(II) sérum + insuline
(III) sérum + insuline + somatostatine

Composés en corrélations	Tr.	$\rho_{(N=6)}$	P(ρ)	b	σ_b
LP_1* / Tre	I	0,942	0,005	0,024	0,0035
	II	0,642	0,17	0,0078	0,0038
	III	0,904	0,01	0,016	0,0031
Glc / PL	I	0,861	0,03	2,69	0,65
	II	0,485	0,33	0,312	0,23
	III	0,933	0,006	1,10	0,17
DG 1-3 / Glc	I	0,887	0,02	0,007	0,0015
	II	0,660	0,15	0,016	0,0074
Tem. exclus (N=5)	III	0,792	0,11	0,0038	0,0012
AG / Glc	I	0,087	0,87	0,0023	0,011
	II	-0,835	0,038	-0,030	0,0081
	III	0,412	0,42	0,0094	0,0085

(*) St + DG 1-2 + TGs

Il est particulièrement intéressant de remarquer que certaines corrélations ne se manifestent que sous l'influence de l'injection d'insuline : c'est le cas de l'interdépendance entre les acides gras et le glucose, illustrée par la figure 27.

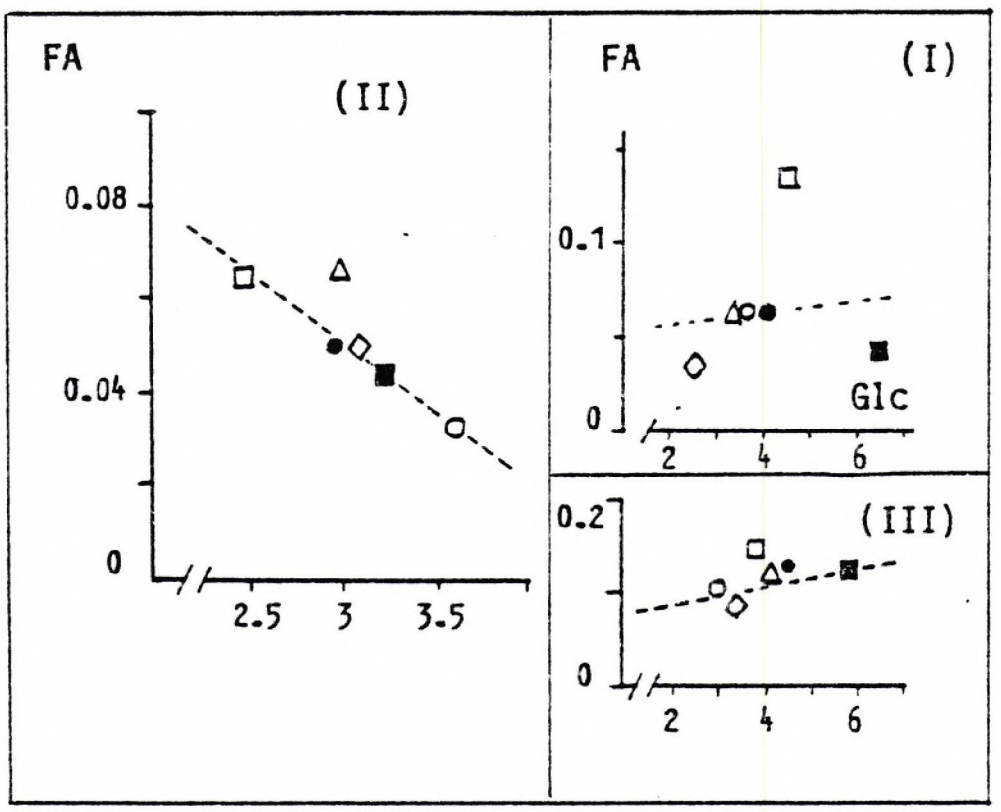


Fig. 27

L'ensemble des résultats, actuellement en cours d'analyse, suggère un schéma interprétatif général hypothétique présenté sur la figure 28.

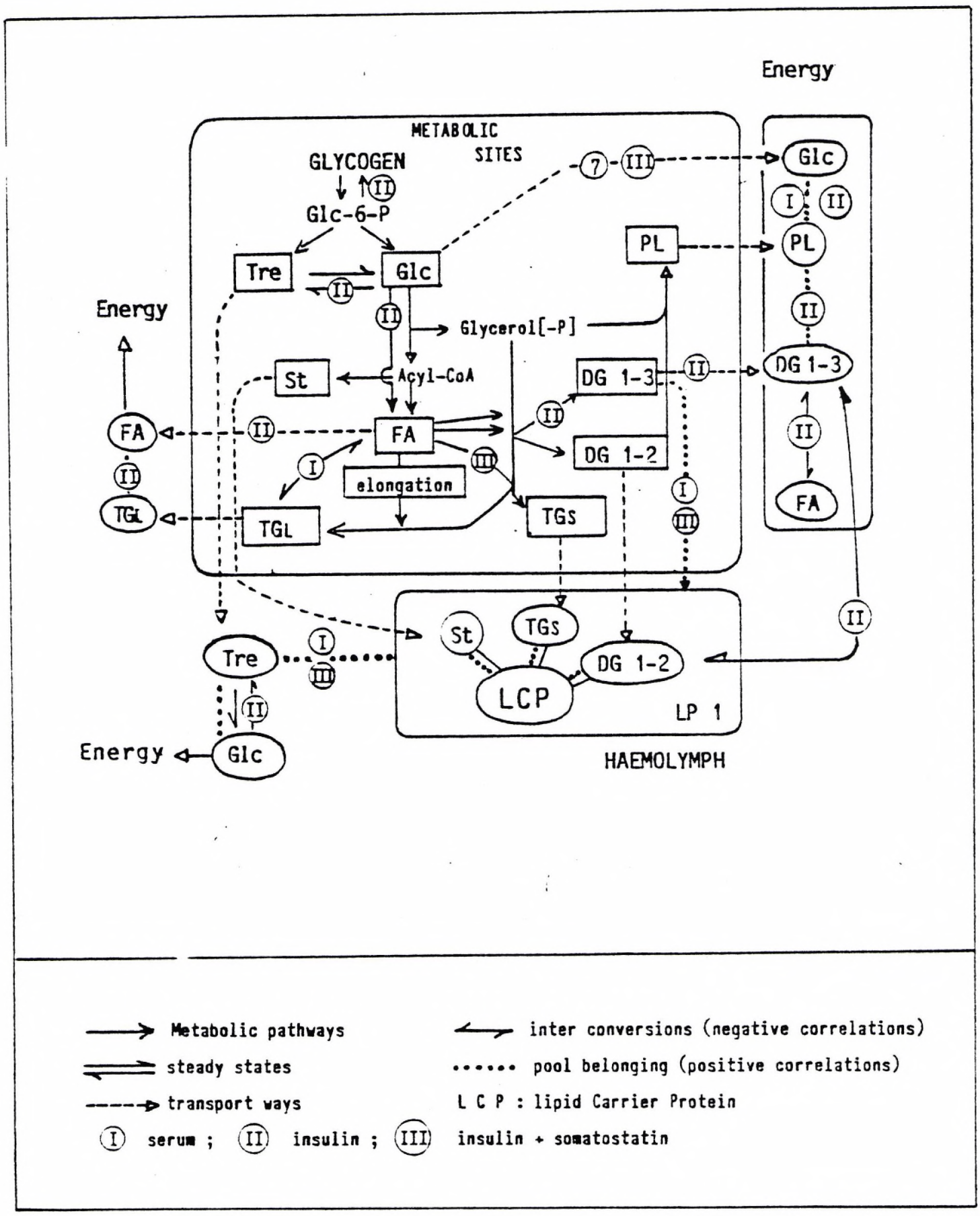


Figure 28

V - RECHERCHES SUR LA COMPOSITION GLUCIDIQUE DE L'HEMOLYMPHE DES SCOLYTES.

(M. BOUNIAS, Mme B. FREROT(*) et M. LEVIEUX(**), avec la coll. technique de Mme M.H. DAURADE).

(*) Laboratoire des Médiateurs Chimiques - Brouessy

(**) Prof., station de Zoologie Forestière, Orléans

L'attaque des forêts de résineux par les scolytes constitue un problème d'une gravité croissante. Un programme de recherches a été abordé au titre d'une collaboration apportée à la station de Zoologie Forestière d'Orléans, avec le concours du laboratoire des Médiateurs Chimiques. La phase la plus importante du travail concerne les pins sylvestres, et sera décrite dans la 3e partie de ce compte rendu annuel.

Des recherches sur la composition glucidique de l'hémolymphe des scolytes ont été d'abord effectuées à Orléans, puis des échantillons ont été amenés au LBC pour un complément d'analyse.

La très forte tréhalosémie des échantillons perturbe la chromatographie et affecte la mobilité des glucides de moindre polarité. Le glucose est présent en faibles quantités, et dans un cas au moins, la présence d'un composé de mobilité voisine de celle du saccharose et du galactose a été notée. Deux fractions de faible mobilité sont constamment présentes. L'une, sur le point de dépôt, peut correspondre au glycogène et l'autre présente des propriétés chromatographiques identiques à celles du stachyose avec des éluants acides, mais différentes sous élution basique où un 3e composant se sépare des deux précédents.

Ces résultats sont résumés dans les tableaux 20, 21, 22.

Tableau 20 - Systèmes éluants utilisés pour la chromatographie en couche mince des glucides. (Température : 27 ± 1°C).

N° éluant	Composition	distance	durée
1	1°) nButanol-éthanol-Ac. acétique-eau (40-10-10-20)	11-12 cm	2 h
	2°) idem	12-13 cm	2 h 20
	3°) nButanol-ac. acétique-eau (60-20-20)	13-14 cm	2h40 à 3h
2	1°) Ethanol-eau-pyridine (60-15-25)	10-11 cm	1 h
	2°) idem	13-14 cm	1 h 30
3	1°) Ethanol-eau-pyridine (60-20-20)	9-10 cm	1 h
	2°) idem	13 cm	1 h 30
4	1°) Ethanol-eau-pyridine	10 cm	1 h
	2°) idem	13,5 cm	1 h 30

Tableau 21 - Chromatographie des glucides étalons sur couches de gel de silice Merck. Les mobilités (MR) sont exprimées relativement à celle du digitoxose, dont le Rf est indiqué sur la base du plus haut front de solvant (dernière migration : 13,2 à 14 cm).

Glucides étalons	Eluant n°1 $\bar{x}$ (Sx) pour N=3	Eluant n°2	Eluant n°3	Eluant n°4
Stachyose	0,073(0,0094)	0,04	0,11	0,04
Ac. glucuronique	0,17 (0,02)	0,06	0,13	0,08
Raffinose	0,126(0,019)	0,17	0,32	0,15
Mélibiose	0,143(0,017)	0,12	0,23	0,11
Gentiobiose	0,160(0,014)	0,17	0,31	0,17
Lactose	0,183(0,017)	0,33	0,49	0,32
Cellobiose	0,237(0,020)	0,32	0,44	0,32
Mélézitose	0,210(0,016)	0,39	0,51	0,36
Tréhalose	0,240(0,022)	0,34	0,51	0,32
Maltose	0,243(0,023)	0,38	0,57	0,40
Palatinose	0,233(0,029)	0,41	0,57	0,40
Galactose	0,307(0,0188)	0,44	0,58	0,41
Turanose	0,310(0,0245)	0,55	0,63	0,52
Saccharose	0,307(0,0188)	0,52	0,64	0,49
Glucose	0,363(0,017)	0,45	0,59	0,44
Fructose	0,407(0,012)	0,50	0,61	0,50
Arabinose	0,410(0,016)	0,51	0,60	0,50
Mannose	0,403(0,026)	0,52	0,62	0,50
Sédoheptulose	0,423(0,017)	0,58	0,68	0,57
Sorbose	0,443(0,017)	0,61	0,68	0,59
Ribose	0,523(0,0094)	0,65	0,72	0,63
Tagatose	0,50 (0,022)	0,73	0,75	0,71
Xylose	0,523(0,012)	0,71	0,76	0,61
Fucose	0,553(0,052)	0,77	0,82	0,75
Erythrose	0,715(0,010)	0,87	0,88	0,86
Désoxyglucose	0,723(0,0094)	0,94	0,95	0,94
Rhamnose	0,757(0,0094)	0,93	0,95	0,93
Désoxyribose	0,803(0,0125)	0,95	0,96	0,94
Digitoxose	1,00 -	1,00	1,00	1,00
Rf du Digitoxose	0,817(0,019)	0,76	0,73	0,76

Tableau 22 - Mobilités relatives (MR) des composants glucidiques observés dans l'hémolymphe des scolytes.

Composants séparés	Eluants n°1 $\bar{x}$ (sx) N=3	Eluants n°3	Eluant n°4	Etalons de MR analogies
n°1	0,00	0,00	0,00	glycogène
n°2	ND	0,05	ND	⩾ tétrose
n°3	0,08(0,008)	ND	0,024	⩾ stachyose
n°4	ND	0,20	ND	mélibiose
n°5	0,23(0,03)	0,52	0,32	tréhalose
n°6	0,31	ND	0,40	galactose
n°7	0,35(0,03)			glucose
n°8	ND	0,80	ND	fucose

ND = non détectés (noter l'hétérogénéité des échantillons)

L'analyse de la glycémie des scolytes constitue donc un problème relativement délicat en raison de l'hétérogénéité qualitative observée entre échantillons différents, et de l'hétérogénéité dans la répartition quantitative des divers constituants dans un même échantillon (très gros excès de tréhalose relativement aux autres formes).

Au total, au moins 6 constituants ont été séparés : l'identification de 4 d'entre eux devra faire l'objet de travaux ultérieurs.

VI - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1 - Extraction des lipides de l'hémolymphe d'abeilles.

L'orientation actuelle des recherches du LBC vers l'étude des relations fonctionnelles glucido-lipidiques nous a conduit à extraire séparément les glucides et les lipides à partir d'un même échantillon d'hémolymphe.

Lorsque les glucides sont extraits en milieu éthanol-pyridine, avec précipitation des protéines, pour supprimer l'action des osidases, la majeure partie des lipides est présente dans le culot, sous forme de complexes lipo-protéiques. Le "détachement" des lipides s'obtient par l'action du chloroforme contenant 20% de méthanol pour faciliter l'extraction des lipides polaires (phospholipides).

Le travail sur des microquantités (50 à 120 µl d'hémolymphe, par exemple) ne permet pas de procéder facilement à une agitation du culot lipoprotéique dans le solvant ; en revanche, l'exposition des tubes aux ultra-sons facilite la dissociation des complexes et la dissolution des lipides libres. Le tableau 23 illustre les cinétiques d'extraction en fonction du temps d'exposition (par "tranches" de 2 mn.

Tableau 23 - Extraction des lipides à partir de 50 à 120 µl d'hémolymphe d'abeille en fonction des paramètres opératoires. Les moyennes et les écarts-types sont données pour 2 répétitions.

Lipides (classes)	protocole d'extraction					
	phase hydro-alcoolique	phase chloroformique : durées de sonication (min)				
		0	2	4	6	8-10
phospholipides	1.2 (0.3)	4.55 (0.04)	5.51 (0.33)	5.84 (0.36)	5.55 (0.34)	6.01 (0.87)
steroïdes	0.05 (0.01)	0.29	0.24 (0.04)	0.26 (0.05)	0.29 (0.02)	0.33 (0.05)
acides gras ①	0	0.032	0.056 (0.02)	0.035 (0.008)	0.042 (0.002)	0.034 (0.008)
acides gras ②	0	0	0.018 (0.003)	0.021 (ND)	0.031 (ND)	0.033 (ND)
mono-acyl glycérols	0	ND			0.0005	0.0026 (0.0005)
diacyl-1-2 glycérols ...	0	0.15	0.14 (0.06)	0.13 (0.05)	0.15 (0.06)	0.15 (0.02)
diacyl-1-3 glycérols ...	0	0.032	0.036	0.038	0.037	0.040 (0.005)
triacyl-glycérols ①	0	0.052	0.086	0.085	0.087	0.086 (0.01)
triacyl-glycérols ②	0	0.045	0.052	0.08	0.06	0.08 (0.01)

acides gras ① = ⩽ C18 ② = C18-C20 triacylglycérols ① = ⩽ C16 ② = ⩾ C18 ND = non déterminé

2 - Conversions inter-photométriques.

Certains étalons très coûteux (chlorophylles : > 250 F / mg) ne peuvent être utilisés à chaque analyse, ce qui exige la détermination de paramètres d'étalonnage "absolus".

Toutefois, ces paramètres sont établis (pour un système chromatographique complètement défini) en fonction des propriétés intrinsèques de l'appareil de mesures photo-densitométriques.

Dans le cas où plusieurs appareils sont mis en service successivement, il est donc nécessaire de disposer des facteurs de conver-

sion. Le tableau 24 indique ceux qui ont été provisoirement établis, dans le cas du dosage des pigments photosynthétiques.

Tableau 24 -

facteurs de conversions entre les photomètres (*) :

Pigments	CS930/CS920	CS930/PH-I-5	CS920/PH-I-5
β carotène	24	845	36
Phéophytine A	16	1085	66
Chloroph. A	24	1584	66,6
Chloroph. B	24	1116	46,8
Lutéine	24	963	40,8
Moyennes :	23,...	1118,...	51,...

(*) Conditions d'enregistrement : CS930 : balayage : 10 mn largeur, fréquence "DELT. Y." : largeur 0,2 mm entre "section". Nombre de points : 8 par "section". PH-I-5 : LB, DO/O → 0,5. NB : cette étude des équivalences est en cours de révision à partir de diverses autres séries expérimentales.

3 - Analyse comparée des spectres d'absorption des glucides révélés au "NEDIAC".

Le réactif de BOUNIAS (Analyt. Biochem., 1980, **106**, 291-295) fait apparaître les glucides sur couche mince de gel de silice avec des colorations présentant des particularités liées à leur structure.

Les capacités techniques du spectrodensitomètre CS930 ont permis la détermination des spectres d'un nombre élevé de molécules. Les résultats, résumés dans le tableau 25, sont illustrés par les planches (I) à (VIII).

Tableau 25 -

Glucides	λ max.(*) (nm)	glucides	λ max. (nm)
Arabinose	560	Mélézitose	540
Ac. glucuronique	490	Mélibiose	535-(560)
Cellobiose	540	Palatinose	540
Désoxyglucose	(435)-530	Raffinose	(530 (555)
Désoxyribose	565	Rhamnose	455-540
Digitoxose	490-590	Ribose	435-550
Erythrose	360 (435) (560)	Saccharose	(530) (555)
Fructose	(530)-555	Stachyose	430 550
Fucose	455-540	Sédoheptulose	330 (470) 500-570
Galactose	540	Sorbose	440 510
Gentiobiose	535	Tagatose	(525) 555
Glucose	540	Tréhalose	535
Lactose	540	Turannose	(455) (520) 545
Maltose	540	Xylose	510
Mannose	(460) (535) 555		

(*) Les épaulements sont mentionnés entre parenthèses.

4 - Analyse des Auxines et des Gibbérellines.

L'analyse par C.C.M. de l'acide indolyl-3-acétique (AIA) avait été abordée voici une quinzaine d'années (publ. MB : 1973, A.I.S., **10**, 40-42) puis laissée en attente. Au cours de 1984, à l'occasion d'une courte recherche sur le dosage des Gibbérellines, dans le cadre du mémoire de fin d'Etudes de licence de Mlle N. THE (Avignon : Phytoprotection), quelques données supplémentaires ont été acquises sur deux autres auxines : l'acide indolyl-3-butyrique (AIB) et l'acide α-naphtyl-acétique (ANA).

Le tableau 26 indique les systèmes éluants utilisés.

Tableau 26 - Eluants pour l'analyse des Gibbérellines sur couches de Gel de silice.

Composition	BBA - 84-1 Benzène, n.butanol, ac. acétique	BBA - 84-2 Benzène, n.butanol, ac. acétique
proportions (v/v)	70 25 5	75 20 5
migrations	8 cm puis 12 cm	6 cm puis 10 cm
n° plaques	84-76 ; 84-72 84-76 ; 84-77	84-73 ; 84-74 [84-78 ?]

Réactifs - a) Le trichlorme antimoine $SbCl_3$ à 20% dans le chloroforme révèle, en principe, les gibbérellines de la façon suivante (STAHL, TLC) :

A_3 et A_7 en pourpre
A_4 et A_8 en brun orange
A_1 - A_5 - A_6 - A_9 en orange pâle
A_2 n'est pas révélée

Les plaques sont chauffées à 80°C jusqu'au maximum visuel d'intensité.

b) L'ac. sulfurique de 5% à 30% dans l'éthanol entraîne une fluorescence par exposition aux U.V. :

Tableau 27	à froid	après 10 mn de chauffage à 120°C
A_3	jaune - vert	bleu turquoise (pendant 1 à 3 mn)
A_7	jaune - vert	gris bleu (pendant 1 à 3 mn)
A_4	—	pourpre (pendant 4 à 8 mn)

c) L'acide perchlorique à 40% dans l'eau est un réactif universel des substances carbonées, utilisé en particulier pour les lipides (M. BOUNIAS, 1981, Analusis, **10**, 31-35). Son application aux hormones végétales a donné de meilleurs résultats que ceux obtenus avec le $SbCl_3$: meilleure sensibilité et révélation de l'ANA (après un temps de chauffage assez long) qui n'est pas coloré par $SbCl_3$.

Le tableau 28 indique quelques valeurs de mobilité chromatographique.

Tableau 28 - Mobilité de quelques hormones végétales sur plaques de silice (Eluants : cf tableau 25) (Rf calculés relativement au plus haut front de solvant).

Composés	Eluant BBA-84-1 pl. 84-72	Eluant BBA-84-2 pl. 84-73, 74
Gibbérelline A_3	0,52	0,50-0,51
AIA	0,75	0,79-0,80
AIB	0,82	0,83-0,85
ANA	non révélé	0,86-0,87
Stéroïdes	0,82	0,86-
Vitamine E	0,83	0,87-0,88
Vitamine D Vitamine K	0,90	0,91-0,93
Pigments chloroph.	0,91-0,97	0,93-1,0

L'étalonnage de la gibbérelline A_3 a été établi pour des quantités comprises entre 0,01 et 10 µg. Les enregistrements ont été effectués en même temps qu'un dosage préliminaire comparé dans des pommes "Golden delicious", "Lys Golden" et "Smoothee". Ils ne pourront être présentés dans ce compte-rendu, n'ayant pas encore été restitués au laboratoire.

5 - Etalonnage des pigments photosynthétiques sur C.C.M.

Les pigments chlorophylliens et caroténoïdiens ont un spectre d'absorption moléculaire dans le visible permettant leur analyse densitométrique directe sur plaques CCM.

Pour un appareil donné, il est alors possible de définir en valeurs absolues leurs paramètres d'étalonnage : c'est le but de ce travail, à partir de pigments étalons hautement purifiés provenant de la firme Sigma.

En raison des équivalences très remarquables entre les spectres établis en phase solide (sur plaques) et ceux tracés à partir de solu-

tions (conditions "standard"), il sera possible de calculer à partir des paramètres mesurés avec le β carotène, ceux qui correspondent aux autres caroténoïdes de type polaires : lutéine, zéaxanthine, néoxanthine, violaxanthine.

En outre, le travail sur des échantillons de pigments hautement purifiés a permis de vérifier l'efficacité de certains traitements, en cours d'étude (cf § 6), destinés à prévenir les artefacts introduits par les conditions opératoires.

A - Chlorophylle A - Mise en solution : dans le chloroforme.
Concentration en solution-mère : 2 mM
Eluant :
Benzène - Heptane - Acétone - Méthanol
(50-30-10-10 v/v)
Dépôts : 0,5 - 1 et 2 nanomoles

Traitement des plaques (gel de silice 60 Merck)
n° 84-34 : non traitée (NT)
n° 84-26 : tampon phosphate 50 mM pH 7,5 (TP)
n° 84-35 : tampon phosphate 50 mM + thiosulfate 20 mM (T+ThS)

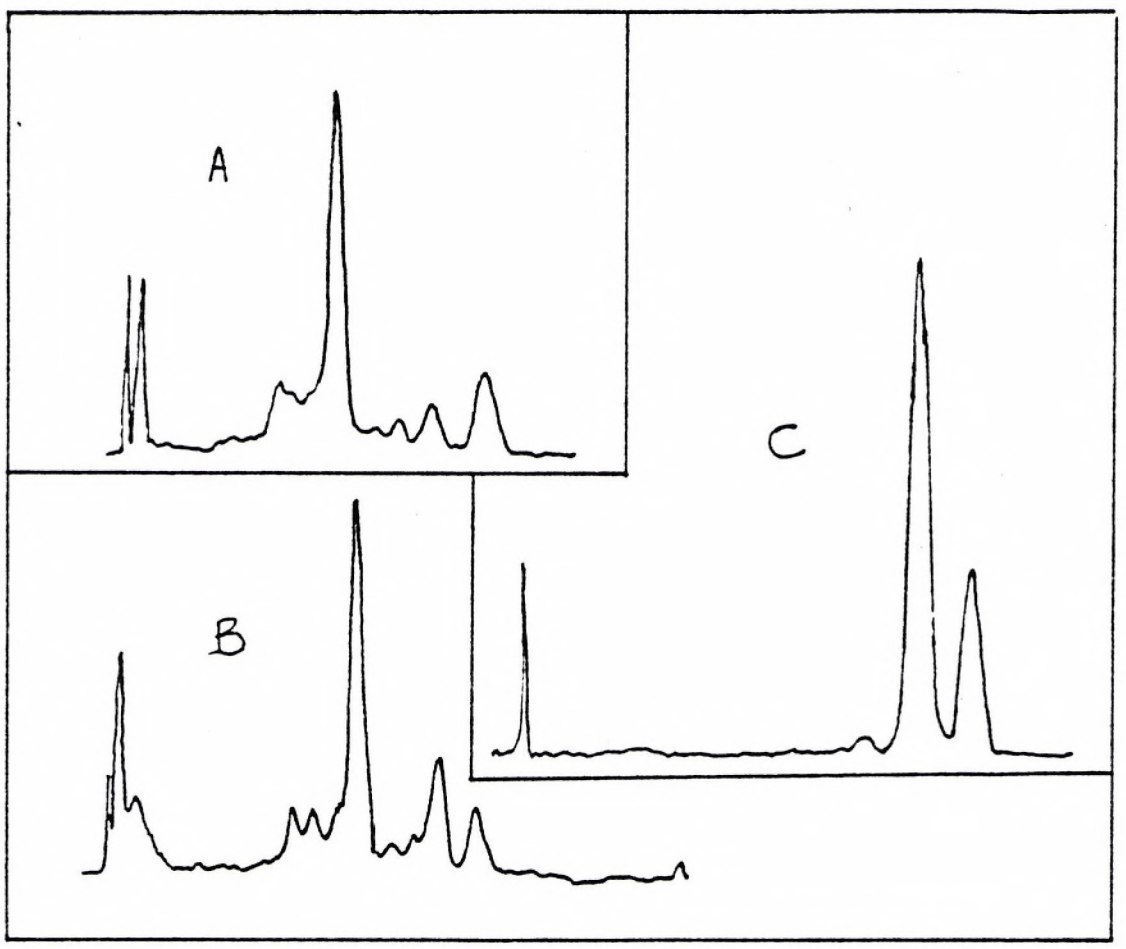


Fig. 29 - Chromatogrammes comparés de la chlorophylle A sur CM de gel de silice.
A=84-34 ; B=84-26 ; C=84-35 (voir texte).

Résultats : La fig. 29 montre les chromatogrammes correspondant respectivement aux 3 traitements précédents. Les "rendements en chlorophylle A" s'établissent comme indiqué dans le tableau 29 (dépôt de 1 nmole).

Tableau 29

	(S) totale	(S) chl. A	% chl. A	% Phéo.
Plaque non traitée	187.666	83.661	44,5	20,2
Tampon	227.260	91.814	40,4	22
Tampon + thiosulfate	257.322	215.007	83,5	8,6

(*) NB : en milieu non traité ou seulement tamponné, il apparait 4 fractions de type phéophytines.

Les courbes d'étalonnage ont été établies dans chaque cas. Avec le traitement le plus favorable, nous obtenons comparativement avec le CS930 (λ 425 nm. Accum. 8 - Delt. Y : 0,2) et le PH-I-5 (DO/0 → 0,5, LB) (tableau 30).

Tableau 30

Chl. A (nmoles)	CS930	PH-I-5	R. CS930/PH-I-5
0,5-Ph. A	62.959	52,5	1.199,2
1 -Ph. A	122.071	101,4	1.203,8
2 -Ph. A	191.482	185,6	1.031,7
Ph. A			
0,5-Chl. A	22.256	21,25	1.047,3
1 -Chl. A	28.546	26,40	1.081,3
2 -Chl. A	20.581	20,4	1.008,9

Coefficient provisoire d'étalonnage Chl. A : x= 1,24 p≃ 120 000^{1,2} (CS930)
ui/nmole x= 1,09 p≃ 100 (PH-I-5)

Connaissant les spectres respectifs de la chlorophylle et de la phéophytine, (fig. 30), il sera possible de déduire leurs coefficients d'étalonnages spécifiques.

Il est important de noter que la conversion de la chlorophylle en phéophytine n'est pas proportionnelle à la quantité déposée : elle est vraisemblablement le résultat de l'action catalytique de la quantité de silice qui absorbe le dépôt.

B - Chlorophylle B - Les mêmes opérations ont été effectuées. Comme précédemment, le traitement (tampon + thiosulfate) donne les meilleurs résultats : les "rendements" globaux sont indiqués dans le tableau 31 (CS930) pour 1 nmole.

Tableau 31

	Plaque non traitée ui. (%)	Plaque tamponnée ui. (%)	Tampon + thiosulfate ui. (%)
Chl. B	49.508 (46%)	27.052 (39,1%)	101.762 (91,8%)
Phéo. B	26.595 (24,6%)	11.451 (16,5%)	-
Chl. B'	13.272 (18,3%)	9.912 (14,3%)	3.944 (3,5%)
Chl. B''	-	2.775 (4,0%)	2.395 (2,1%)
Chlorophyllides	3.165 (4,3%)	15.810 (22,8%)	1.254 (1,1%)

Les courbes d'étalonnage (fig. 31) sont établies comme précédemment à λ 425 sur CS930 et LB sur PH-I-5. Les résultats numériques sont indiqués dans le tableau 32.

Tableau 32

Qté (nmoles)	0,5 x 0,925	1 x 0,918	2 x 0,857
Chl. B : CS930	54.734	101.763	145.343
PH-I-5			
Qtés corrigées	0,462	0,918	1,714

Coefficient provisoire d'étalonnage chl. B : x= 1,2 ui/nmole = 100 000^{1,2} (CS930)
x= — = — (PH-I-5)

C - β Carotène.

La solution mère titre 5 mM. Sur des plaques imprégnées de tampon phosphate pH 7,5 (50 mM), le "rendement" se situe à 82,4% ; 87,8% ; 91,5% pour diverses répétitions. Les paramètres d'étalonnage sont indiqués dans le tableau 33.

Tableau 33

Quantité (nmoles) ...	0,2	0,4	0,8
coeff. provis. corr.	x 0,824	x 0,833	x 0,878
Quantités corrigées	0,165	0,332	0,702
β Carotène : CS930 (λ425) PH-I-5 (LB/0 → 0,5)	100.989	151.628	214.137

Sur plaques non tamponnées, le rendement est du même ordre de grandeur.

Sur plaques tamponnées et traitées au thiosulfate, en revanche, l'action réductrice du traitement aboutit très rapidement à une modification des chromophores du β carotène comme si la réduction de certaines double-liaisons affectait l'absorption (le tableau 34 indique dans quelles proportions).

Tableau 34 - Etalonnage du β carotène.

	50 picomoles	100 picomoles	200 picomoles
Plaque non traitée CS930 PH-I-5	9.889	68.329	80.479
Tampon + thiosulfate CS930 PH-I-5	-	30.568	44.133
Etalonnages provisoires :		x	P ui^{x}/nmole
Sans traitement : CS930		0,7	450
PH-I-5		-	-
Tampon + thiosulfate CS930		> 1	250
PH-I-5			

Les spectres d'absorption moléculaire du β carotène pur sont présentés sur la figure 32.

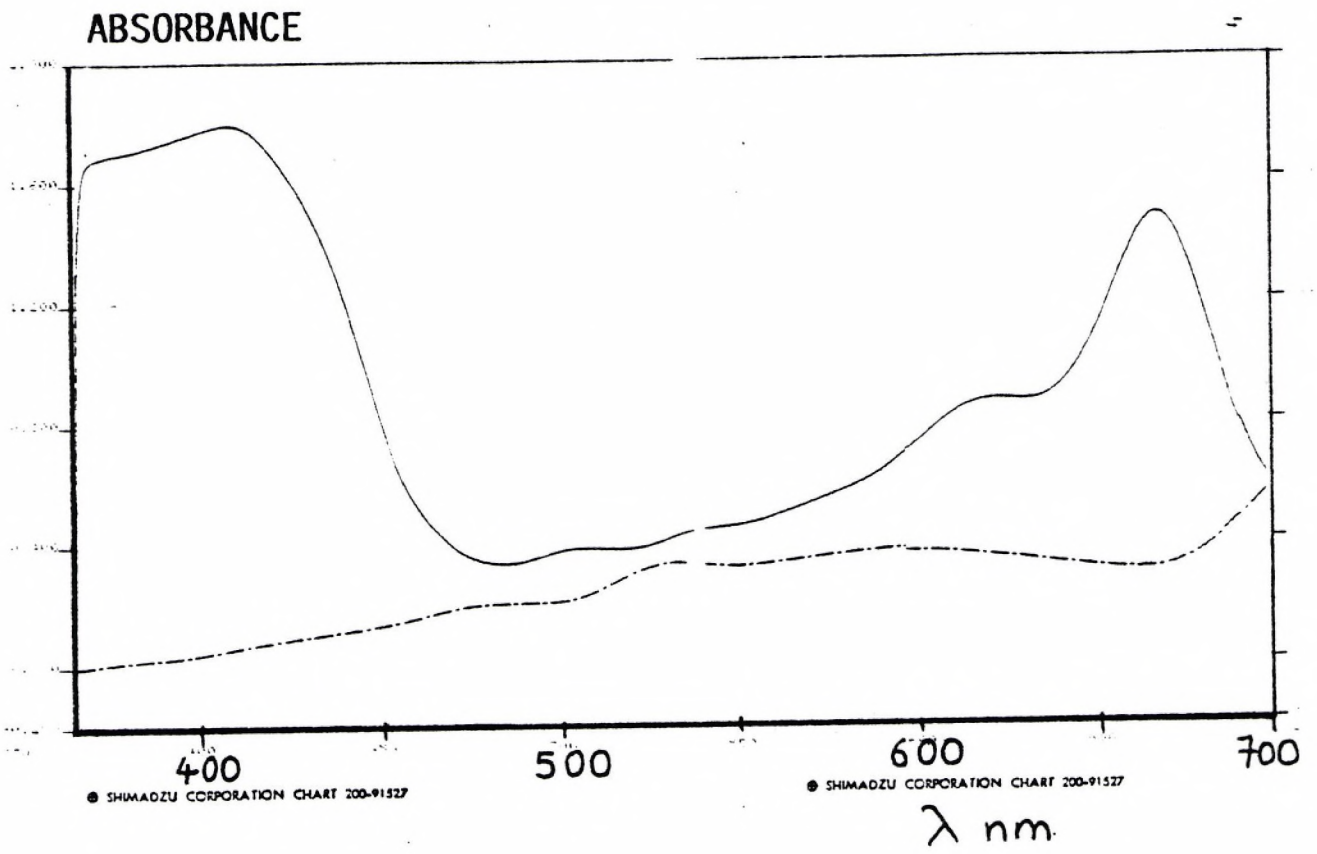


Fig. 30 - Spectre de la Chl. A et de la Phéophytine A étalons établi en phase solide sur couche de gel de silice imprégnée d'antioxydant.

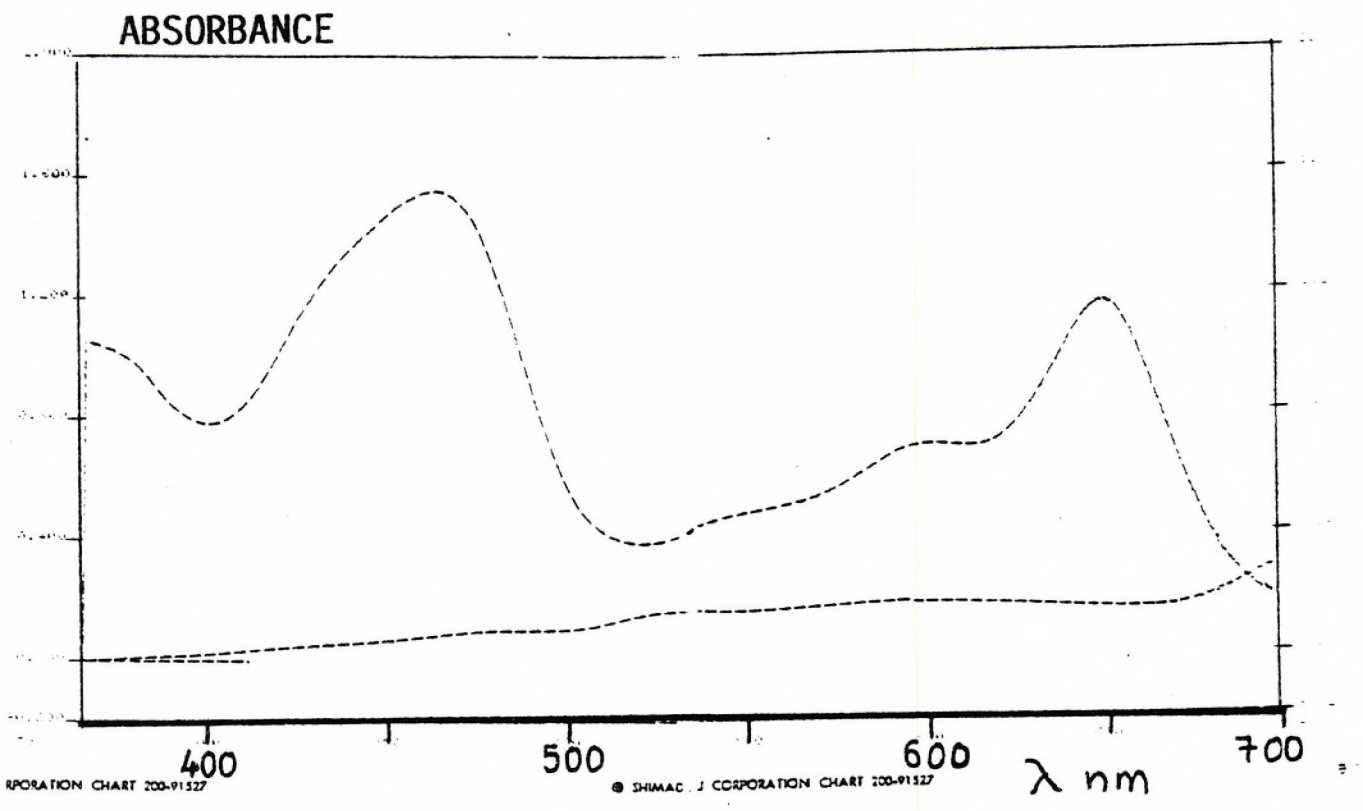
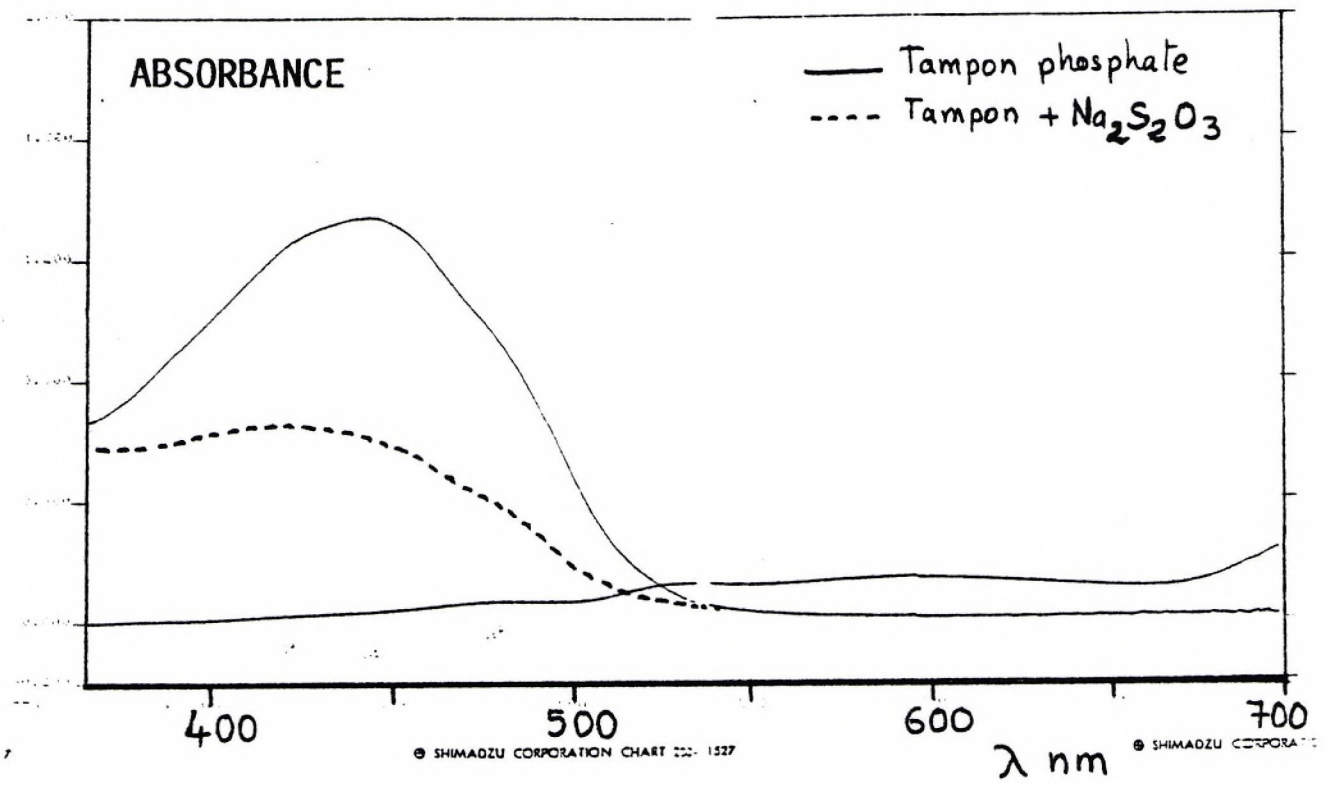


Fig. 31 - Spectre de la Chlorophylle B étalon établi en phase solide sur couche de gel de silice imprégnée d'antioxydant.



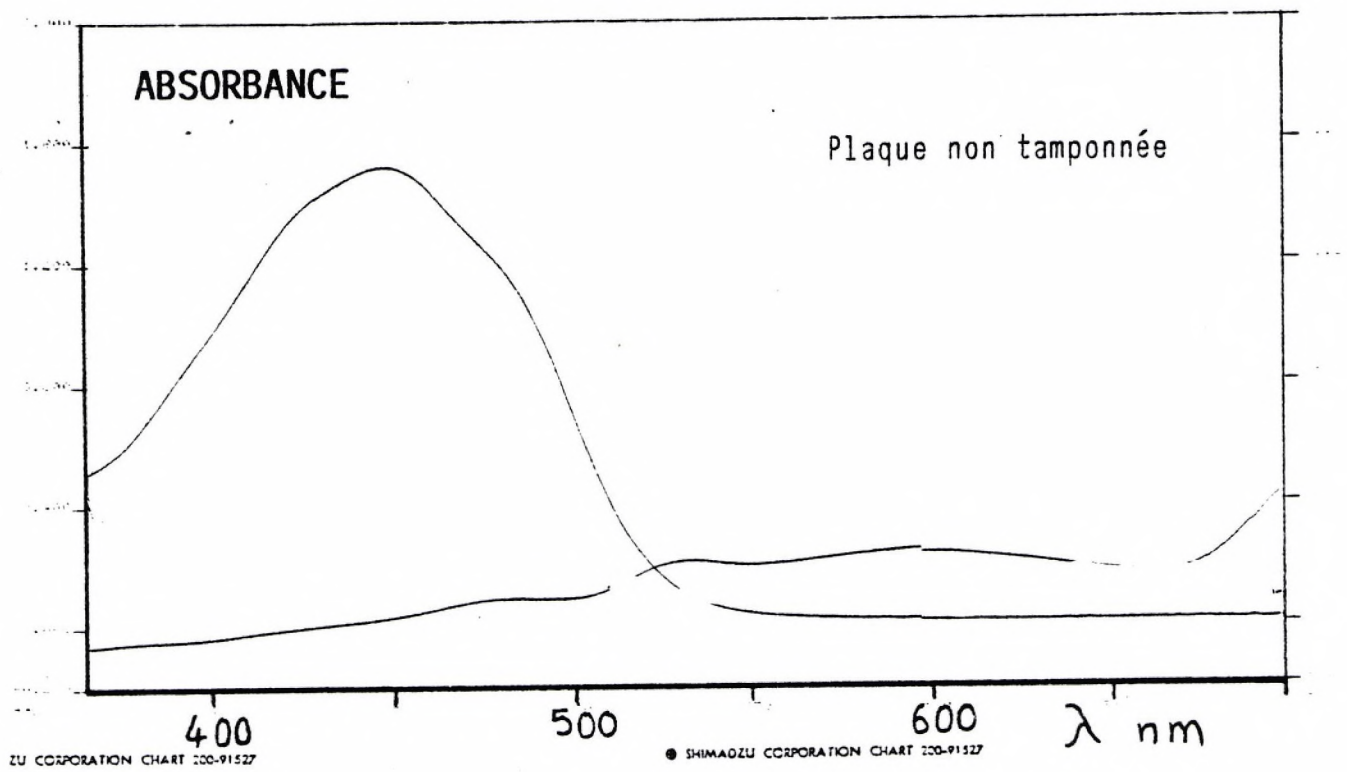


Fig. 33 - Spectre du β Carotène étalon établi en phase solide sur couche de gel de silice : influence du traitement des plaques.

6 - Les artefacts dans l'analyse des pigments photosynthétiques.

Le chapitre précédent a montré que le traitement des plaques peut modifier considérablement la physionomie des chromatogrammes. Le travail d'amélioration des techniques est loin d'être achevé, même si des progrès très substantiels ont été effectués.

Les opérations de recherches effectuées sur plaques de silice sont résumées ci-dessous. Toutefois, l'idée d'abandonner la silice, malgré ses avantages résolutifs, est envisagée, en raison de sa trop forte polarité, génératrice d'altérations catalytiques, au profit de supports plus "doux", récemment apparus sur le marché (plaques à structure aminée Réf. 15647) si les premiers essais, prévus pour 1985, s'avèrent concluants.

Origine du problème : les deux causes principales d'anomalies sont la perte de Mg^{++} du noyau hématinique de la chlorophylle A qui est convertie en phéophytine, et l'oxydation progressive des chlorophylles en formes A', A" (B', B") de polarités croissantes et donc de mobilités décroissantes. Le déclenchement de ces processus peut se manifester de deux manières :

a) durant le temps de contact du dépôt avec la silice avant migration: on observe alors une multiplication du nombre de composants.

b) en cours de migration (au delà d'une certaine distance ou durée) : ceci entraîne donc la formation de "trainées" continues qui rendent le chromatogramme inexploitable.

- Principe des essais : trois solutions ont été envisagées, isolément ou en combinaisons :

- imprégnation de la plaque par Mg^{++} pour limiter son éjection de la molécule porphyrinique par "action de masse"
- ajustement du pH de la plaque à un seuil neutre ou légèrement basique (pH 7,5) car la phéophytine se forme spontanément en milieu acide
- imprégnation de la plaque par un antioxydant ($Na_2 S_2 O_4$)
- Résultats - L'agent le plus efficace est l'antioxydant (employé à la concentration de 15 mM) mais des conséquences négatives apparais-

sent malheureusement, comme indiqué précédemment : "décoloration" du β carotène et oxydo-réduction des xanthophylles en fonction de la durée du contact. C'est donc vers les traitements "Tampon" et Mg^{++} ($MgCl_2$) qu'ont été orientées les expériences ultérieures.

Des dépôts correspondant à des concentrations d'extraits identiques sont effectués à intervalles de 5 mn. Les quantités mesurées expriment donc des cinétiques de dégradation en fonction du temps de contact avec les plaques.

1 - Le β carotène - Le tableau 35 indique une série de résultats exprimés en unités d'intégration PH-I-5(1) et CS930(2) : l'expression en nanomoles par dépôt peut être estimée par conversion linéaire selon les données du tableau 33.

Tableau 35

Temps de contact :	5 mn	10 mn	15 mn
Plaque non traitée(1) ..... :	70	73	55
Tris 1M pH 7,5 + $MgCl_2$ 15 mM ... : (1)	78	61	57
Phosphate 50 mM pH 7,5(1) ..... :	52	48	33
Phosphate 50 mM + :			
Mg Cl_2 10 mM(2) ..... :		31.000	
20 mM(2) ..... :		23.000	
40 mM(2) ..... :		26.000	
60 mM(2) ..... :		28.000	

Le rendement en β carotène est compris entre 78% (Tris + $MgCl_2$) et 95% (sans traitement) pour des temps de contact non supérieurs à 10 mn.

2 - La Lutéine - Les résultats sont indiqués dans le tableau 36, homologue du n° 35.

Tableau 36

Temps de contact	5 mn	10 mn	15 mn
Plaque non traitée	76	88	92
Tris + $MgCl_2$	56	18	11,2
Phosphate	57	42	46,5
Phosphate +			
$MgCl_2$ 10 mM			51.409
20 mM		51.709	
40 mM		46.441	
60 mM	40.110		

La lutéine n'a été affectée par le temps de contact qu'en présence de Tris.

3 - Phéophytines - Leur concentration varie en fonction de la concentration en chlorophylle A, principalement. La chlorophylle B est plus stable et moins altérée. Les résultats sont indiqués dans le tableau 37 (voir légende : tableau 35).

Tableau 37

Temps de contact	5 mn	10 mn	15 mn
Plaque non traitée	14	17	23
Tris + $MgCl_2$	15	19	14
Phosphate	21	22	18
Phosphate + $MgCl_2$: 10 mM		48.000	
20 mM		35.000	
40 mM		42.000	
60 mM		31.000	

La présence de $MgCl_2$ comme celle de tampon phosphate pH 7,5 améliorent les résultats. Le Tris n'est pas aussi défavorable que pour la Lutéine mais il n'apporte rien.

La figure 33 montre les chromatogrammes comparés de deux extraits chromatographiés sur plaque à double traitement :

Tampon phosphate 50 mM pH 7,5 + $MgCl_2$ 20 mM (I)

ou + $Na_2S_2O_4$ 20 mM (II)

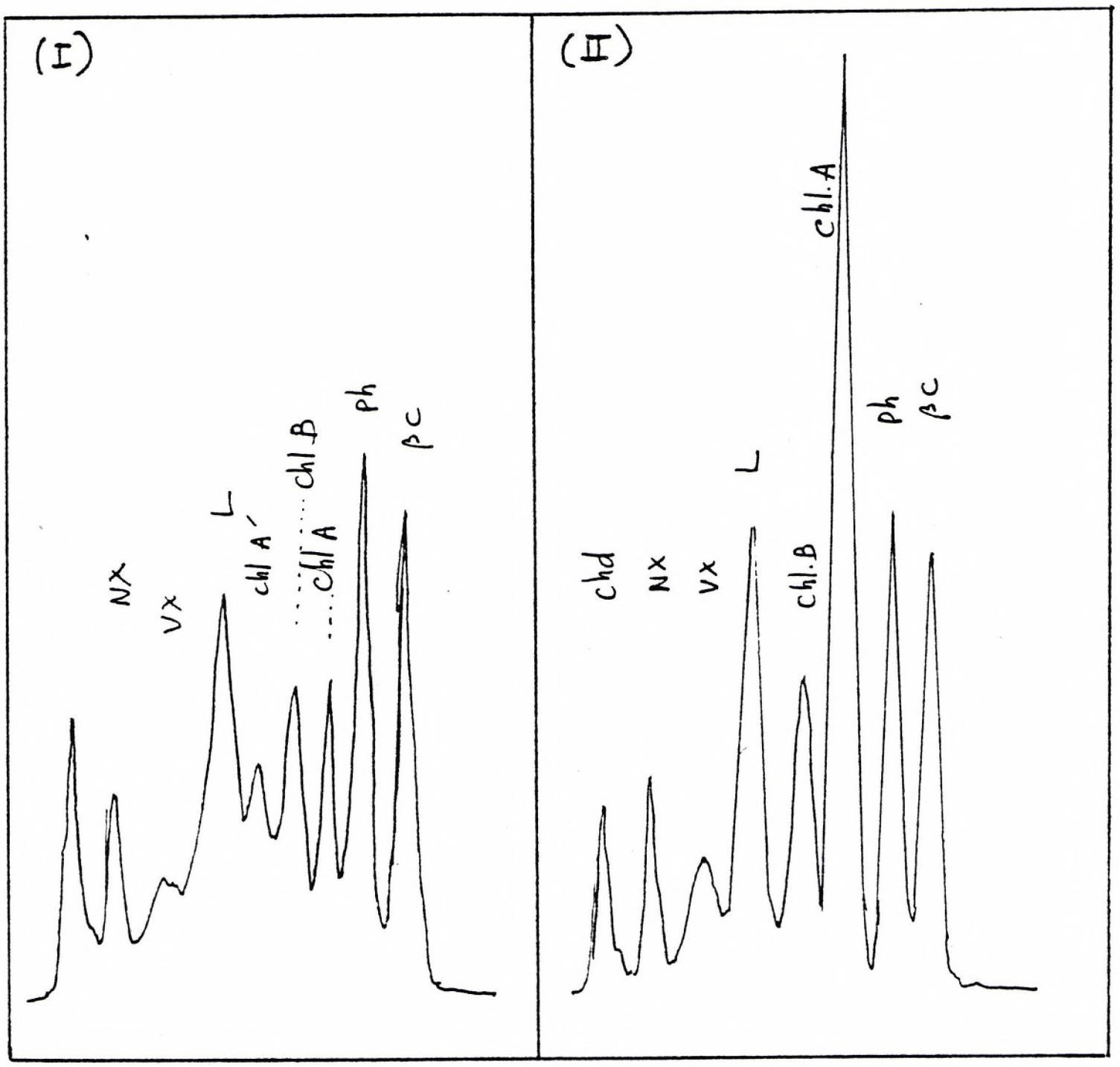


Fig. 33

Les résultats montrent que le traitement (I) pallie efficacement tous les artefacts sauf celui de l'oxydation de la chlorophylle A.

Il conviendrait donc maintenant d'essayer d'autres antioxydants plus "doux" ou de diminuer encore la concentration de $Na_2S_2O_4$.

Projet d'étude -

- Déposer du β carotène pur à diverses concentrations
- Imprégner les plaques de $Na_2S_2O_4$ à diverses concentrations
- Déterminer les équations donnant la vitesse de dégradation (v) du β carotène :

  v = f[βC] avec [$Na_2S_2O_4$] cste

  v = f[$Na_2S_2O_4$] avec [βC] cste

  d'où découlerait, avec une estimation des ordres partiels de la réaction (certainement ≠ 1), la concentration optimale du $Na_2S_2O_4$.

- Systèmes éluants - Dans les conditions d'imprégnation par le phosphate 50 mM pH 7,5, l' éluant (heptane-acétate d'éthyle) dans les proportions (50-50), (40-60), (30-70), (25-75), permet une séparation d'autant meilleure du groupe : β carotène, phéophytine A, chl. A, que la concentration de l'heptane est plus élevée. Mais les chlorophyllides oxydées gênent la séparation de la lutéine (plaques n°84-10/11/12/23). L'éluant "quaternaire" benzène-heptane-acétone-méthanol (50-30-10-10) donne de bien meilleurs résultats quant à la résolution des divers pics (pl. n°84-22) : fig. 34.

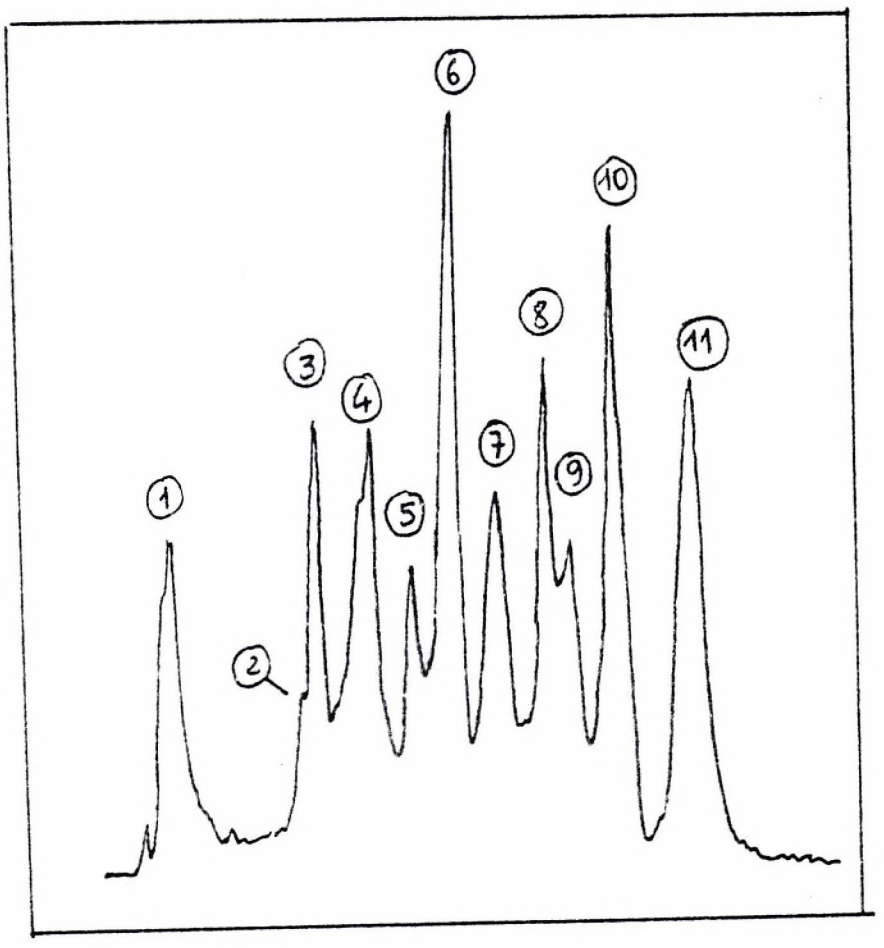


Fig. 34 - Composants séparés sur CCM (silice) avec imprégnation de tampon phosphate pH 7,5/50mM ① phéophorbides ; ② chlorophyllides ; ③-④-⑤ xantophylles ⑥ chloroph. A' ; ⑦ chloroph. B ⑧ chloroph. A ; ⑨ phéophytine A' ou B ; ⑩ phéophytine A ; ⑪ β carotène

L'une des principales difficultés rencontrées dans cette étude provient de l'hétérogénéité de la stabilité des composants pigmentaires d'un échantillon à un autre : les expériences ayant été, pour la plupart, réalisées entre février et mars il semble acquis que la période hivernale provoque l'apparition de grands écarts de stabilité de la chlorophylle A : il s'agit là d'un problème d'ordre physiologique, s'ajoutant (ou même **créant** parfois) aux difficultés techniques.

Nous avons remarqué que la conservation au froid (-20°C) et à l'obscurité d'un échantillon initialement stable entraîne également une "fragilisation" comparable des pigments. D'autre part, des extraits déposés sur une plaque maintenue 10 mois au congélateur on montré une bonne stabilité des chlorophylles (rendement ∿ 100%) mais une disparition quasi totale du β carotène.

NB - Voir applications aux "Traumatismes Végétaux" : 3e partie, chap.

VII - DETERMINISMES ELECTROMAGNETIQUES DANS LES FONCTIONS BIOCHIMIQUES FONDAMENTALES : UNE NOUVELLE PHARMACOLOGIE. (M. BOUNIAS).

La cellule vivante est, à l'échelle moléculaire, un vaste réseau tri-dimensionnel de structures soumises à des variations de polarité qui en déterminent le fonctionnement. La plupart des fonctions biochimiques sont dépendantes de forces du type des liaisons "hydrogène" ou "Van der Waals", mettant en jeu de très faibles variations d'énergie. Tout événement susceptible d'agir sur les interactions électromagnétiques (**em**) cellulaires est présumé jouer un rôle -au minimum- sur les mécanismes régulateurs.

Une conférence a été donnée sur ce sujet le 6-12-84 au "Colloque de Biologie théorique" de Fresnes, à la demande de la "Société Internationale de Biologie Mathématique". Ce domaine de recherches est appelé à se développer considérablement dans un futur assez proche : l'INRA aura tôt ou tard un rôle à y jouer, ne serait-ce que du fait de la pratique par de nombreux agriculteurs de "l'électroculture" : cette technique, déjà très ancienne, est utilisée par des exploitants regroupés en associations, qui développent pour leur propre compte -avec des

résultats positifs- des recherches empiriques. Divers ouvrages, parfois récents (BOSC DE VEZE : 1983 - L'électroculture - Panorama Ed.) contribuent à renforcer l'idée qu'il s'agit là d'un domaine que la Science devrait explorer. En outre, toutes les relations de reconnaissance moléculaire (membranaires, enzymatiques, hormonales) pourraient être étudiées en considérant les mécanismes sous l'angle des interactions em mises en jeu.

Les pages qui suivent relatent les aspects les plus généraux de la conférence.

I - LES CIBLES BIOCHIMIQUES CELLULAIRES

I - 1 - Les membranes - Le premier acte qui a permis à un aggrégat de matière organique d'acquérir, à terme, le statut d'Etre Vivant, c'est probablement celui de s'entourer d'une membrane à la fois protectrice et fonctionnelle ... Et c'est justement ce "protectionnisme" dont la Vie s'est parée dès son origine, qui offre la première "cible" aux champs em.

Qu'elles soient externes ou internes, les membranes ne sont jamais de simples parois, mais bien de véritables organes cellulaires.

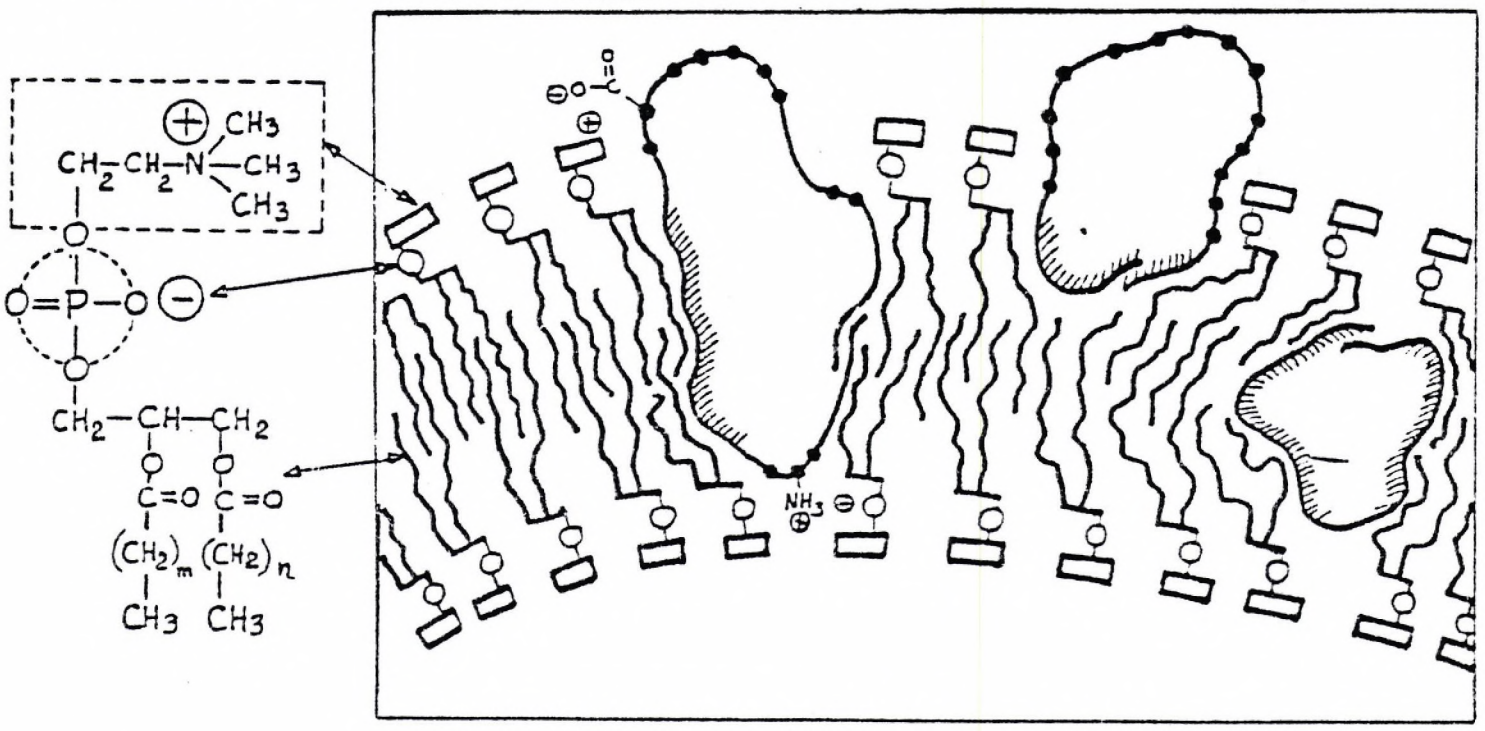


Fig. - Les membranes biologiques sont formées d' une double couche de phospholipides (représentés, à gauche, par la phosphatidyl-choline). Ceux-ci sont réunis par affinité de leurs chaines apolaires (acides gras) tandis que les '' têtes polaires'' tapissent les surfaces extérieure et intérieure. Les protéines se disposent en surface ou à l' intérieur en fonction des affinités de polarités des radicaux extérieurs des maillons de leur chaines d' amino-acides

(~~~~~~~~) : zones apolaires (lipophiles) : Leu, Ile, Val, Phe, Try ...

(—●—●—●) : zones polaires (hydrophiles) : Asp, Glc, Lys, Cys, Ser ...

En elle-même, la membrane cellulaire est déjà auto-génératrice de champs em induits (PILLA et al., 1983, J. Biol. Phys., **11**, 51-58) susceptibles d'intervenir dans les relations avec les ligands protéiques (GOMEZ-JERIA, 1983, speculations Sci. Technol., **6**(2), 157-158), voire même, selon BOWEN et LEWIS, 1983 (Thin solid films, **99**(1-3), 157-163) de conduire à des phénomènes de "robinets" à partir des forces répulsives créées par les dipôles ($P^{\oplus}$-$N^{\ominus}$) résultants de l'interaction électrostatique entre les "têtes" polaires.

Déjà, en 1981, MODAK A.T. et al. (Bioeletromagnetics, **2**(1), 89-92) observaient que la perméabilité des membranes augmentait dans le cerveau de rats exposés à des champs em pulsés (2450 MH_Z, 15 ou 25 ms).

Les champs électriques provoquent une augmentation réversible de la perméabilité et de la conductivité des membranes, jusqu'à certains seuils critiques (LAFON E.E. & POHL, H.A., 1981, J. Biol. Phys., **9**(4), 209-217). Des ruptures ont été observées dans des érythrocytes avec des intensités de l'ordre de 1 à 10 Kv. cm^{-1} (BEN SASSOU, S.A. et al., 1982, Anal. Quant. Cytol., **4**(4), 309-314). De telles ruptures se produisent en des zones localisées, étant donnée la distribution hétérogène des charges dans l'espace et dans le temps (VAN KOOTEN O., 1984, Trends Biochem. Sci., **9**, 222. HARAUX F. & de KOUCHKOVSKY, Y., 1982, Biochim. Biophys. Acta, **679**, 235-247) et des molécules de faible taille peuvent pénétrer par diffusion à travers les pores ainsi créés (KNIGHT, D.E., 1982, Techn. Life Sci. : Physiol., P 1/1 (P113), 20 pp.).

Des études réalisées sur des membranes constituées in vitro à partir de stéroïdes et de lectines, ont montré que des champs électriques intenses pulsés (10 sec) provoquent une augmentation graduelle réversible de conductance jusqu'à un seuil où celle-ci chute brusquement ; STULEN G. (1981, Biochim. Biophys. Acta, **640**(3), 621-627) situe le seuil de réversibilité vers 10^5 $v.cm^{-1}$, dans le cas de membranes reconstituées in vitro à l'aide de phosphatidyl-choline. L'apparition et le développement de pores pourraient être ainsi commandés par les champs E (CHERNOMORDIK L.V., et al., 1983, Biochim. Biophys. Acta, 736, 203-213).

Enfin, NEUMANN a dressé en 1983 un bilan de l'influence dynamique des champs électriques intenses sur la conformation des protéines membranaires (Stud. Biophys., **94**, 107-114). Notons, à ce sujet, que compte tenu de la structure des phospholipides qui constituent une grande partie des membranes, il était logique que STULEN parvienne dès 1981 à la conclusion que les champs E affectent considérablement les "têtes polaires" tandis qu'ils restent très peu influents sur les chaines aliphatiques apolaires.

I - 2 - Canaux et transporteurs - La membrane contrôle l'entrée et la sortie des substances impliquées dans le métabolisme : celles-ci peuvent en l'occurence, être classées en deux catégories principales : les ions minéraux et les molécules organiques (électrolytes ou non).

La traversée des ions métalliques s'effectue à travers des "pores" qui se résument, très schématiquement, à des inclusions polaires enchâssées dans la double couche lipidique : leur fonctionnement est étroitement associé aux modifications de polarisations intra-cellulaires (M. LAZDUNSKI, 1984, HEITZ et al., 1984 ; "Pharmacol. : aspects moléc. et fonct.", coll. Stés de Biol. et de Bioch., Montpellier, 9 Nov.). Quant aux composés organiques, ils ont recours à des systèmes dits "perméasiques", dans lesquels des molécules réceptrices les prennent en charge d'un côté de la membrane et la leur font traverser.

Cations minéraux et molécules organiques sont très souvent associés dans ces processus, qui font intervenir des modifications de potentiels électrostatiques : ainsi, le transporteur du glucose fait appel au calcium ca^{++}, tandis que le transport de l'ion potassium s'effectue parfois grâce au radical carboxylique d'un "passeur" organique (GAVACH et al., 1983, Stud. Phys. Theor. Chem., 24, 265-273).

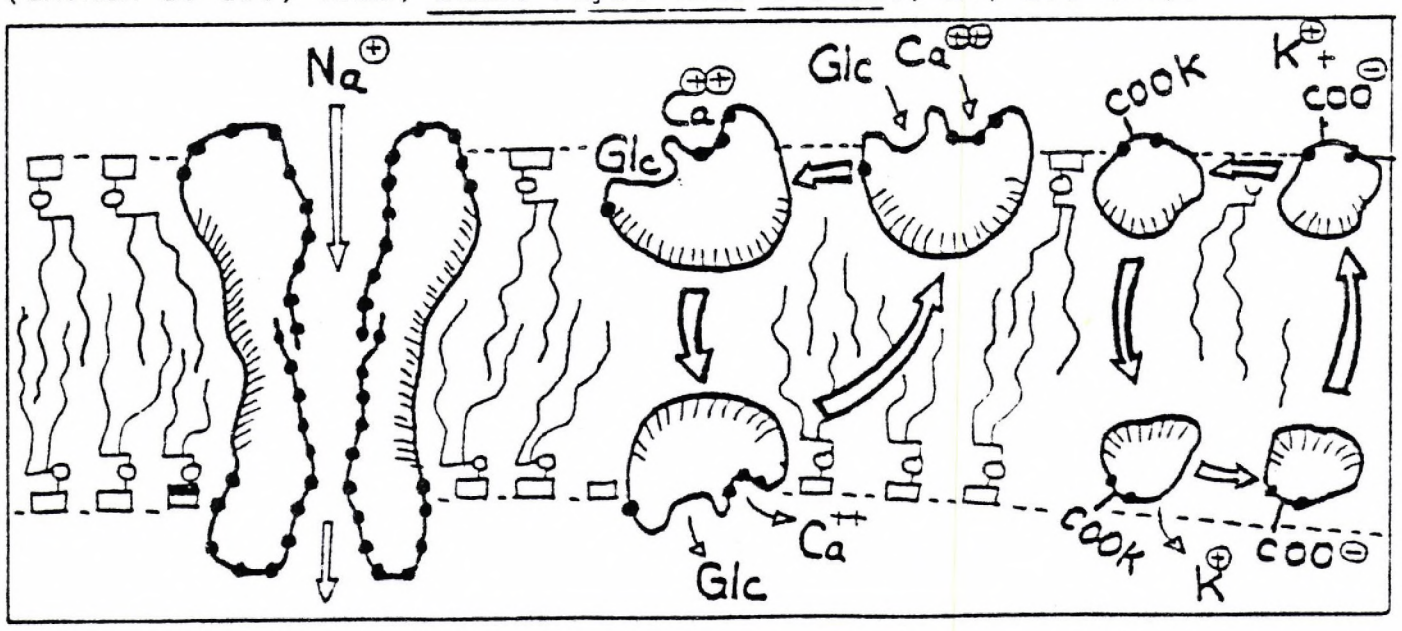


Fig.36 - Quelques exemples de ''passeurs'' trans membranaires : pore cationique, glucose--permease calcium-dépendante, et transporteur organique de l'ion potassium

zones lipophiles polaires — zones moléculaires polaires (ionophiles)

Il apparaît donc à l'évidence que les mouvements de charges et de potentiels électrostatiques dits "adjacents", à l'interface de la membrane et des solutions, vont jouer un rôle déterminant dans les mécanismes de déplacements trans-membranaires. Certaines recherches fondamentales font, d'ailleurs, appel à l'action de molécules bi-cationiques, telles que les ions (n) méthonium dont la distance (d) entre les charges intervient, conformément à la théorie de GOUY-CHAPMAN, sur les potentiels adjacents des doubles couches lipidiques porteuses de charges négatives (Mc LAUGHLIN A. et al., 1983, J. Membr. Biol., 76, 183-193), et sur leur capacitance ainsi que sur l'action des transporteurs (nonactine) et des pores (gramicidine)(ALVAREZ O. et al., 1983, Biophys. J., 44, 333-342).

Quant à l'action de paramètres électro-magnétiques externes, un simple calcul théorique montre déjà que les mouvements de concentrations des électrolytes peuvent être affectés par l'action de champs électrostatiques de l'ordre de 10^6 à 10^7 V. m^{-1} (VEVE, J.C. et BOUNIAS, M., 1982 : rapport LBC, p. 19-21) : toutefois, les mouvements réels peuvent s'écarter de ceux prévisibles, d'après les caractéristiques du champ externe, en raison, précisément, des forces résultant de la distribution de polarisation des ions (RABINOWITZ J.A., 1982, J. Theor. Biol., 99(2), 377-389).

Expérimentalement, des champs électriques alternatifs agissent sur la sortie de l'ion Ca^{++} des cellules de tissus cérébraux : mais le phénomène se manifeste à des fréquences (16 Hz) et à des intensités (5 à 7,5 V.m^{-1} ou 35 à 50 V.m^{-1}) définies, intercalées entre des zones de valeurs sans action (BLACKMANN et al., 1982, Radiat. Res., 92 (3), 510-520). De même, dans les érythrocytes, l'entrée de cations mono valents est stimulée par un champ E alternatif (SERPESU, E.H., & TSONG, T.Y., 1983, J. Membr. Biol., 74(3), 191-201).

D'autre part, l'utilisation de champs em pulsés de très basses fréquences a fait apparaître l'existence de transporteurs du calcium ca^{++} liés à la présence de l'anion HCO_3^- (COLACCIO, G. & PILLA, A.A., 1983, Z. Naturforsch., C : Biosci., 38c(5-6), 465-467).

Quant à la perméabilité des membranes aux molécules organiques, de récentes recherches sur des drogues pharmacologiques en a fait apparaître de sensibles variations sous l'action de champs em de basses fréquences (DUNAEV V.V. & KARPENKO A.V., 1983, Farmakol. Toksikol. (Moskow), **46**(1), 62-65).

D'autre part, la structure même des canaux et des transporteurs peut-être modifiée par l'influence de champs électriques ou magnétiques. Dès 1980, YOSHIDA et al. (Biophys. Chem., **11**(3-4), 369-375 ; Int. J. Biol. Macromol., **2**(4), 213-216) montrait que des champs électriques intenses pouvaient modifier la structure hélicoïdale de polypeptides ionisables (structure de pore). Plus récemment, il est apparu que le mode d'association des protomères de protéines du type des tubulines pouvait être fortement altéré par des champs électriques (KANAZIRSKA M. et al., 1983, Stud. Biophys., **94**, 141-142) dont l'orientation détermine celle des microtubules (VASILEV P. et al., 1983, Stud. Biophys., **94**, 139-140). Il s'agissait dans ces derniers cas, de champs électriques et magnétiques de faible intensité (5 $mV.cm^{-1}$ à 2 $V.cm^{-1}$) et de fréquences de 10 Hz à 2 MHz, constants (90 $oe.cm^{-1}$) ou pulsés. Selon les auteurs, le maximum d'effets serait produit par des champs hétérogènes.

Enfin, des phénomènes d'amortissements oscillatoires relatifs à la conformation et à la densité des canaux ioniques ont été modifiés par des champs électriques de fréquences 10^{-1} à 10^{-3} Hz, (c'est-à-dire voisines de celles des mécanismes régulatoires concernés), avec apparitions de phénomènes d'hystérésis (MARKEVITCH, N.I. & SEL'KOV E.E., 1983, Biofizika, **28**(2), 260-265).

I - 3 - Déplacement des substrats dans le milieu cellulaire - Les ions et les métabolites doivent se mouvoir pour gagner leurs sites réactionnels ou de transfert dans les divers compartiments cellulaires : le hyaloplasme, les cavités et vésicules du réticulum endoplasmique, les saccules golgiennes, les espaces inter-membranaires et le stroma ou la matrix, respectivement, dans les mitochondries et les chloroplastes. Le simple calcul théorique (VEVE et BOUNIAS, op. cit.) suggère que la trajectoire des ions pourrait être refermée sous l'action de champs magnétostatiques de l'ordre de 2.10^{-9} T dans le hyaloplasme et de $2{,}5.10^{-5}$ T à l'intérieur des membranes, ce qui attire immédiatement l'attention sur l'influence originelle du champ magnétique terrestre (5.10^{-5} T). De même, l'action conjuguée de la composante électrique $\vec{E}$ et de la composante magnétique $\vec{M}$ (constantes) sur le déplacement de substrats ionisés pourrait, assez curieusement, se manifester par une ligne de force spiralée, selon une cycloïde dont la fréquence (N) est liée à la composante B, l'amplitude maximale A_M et la période spatiale Py, aux composantes B^2 et E (N, A_M et Py étant fonction directe ou inverse du rapport q/m : charge/masse de l'ion). Enfin, le calcul des forces de volumes d'origine électrostatique et magnétostatique (liées à l'anisotropie des milieux) sur les milieux intra ou inter-cellulaires supposés diélectriques, peut être ébauché, à partir de l'expression du tenseur des contraintes σ_{ik} du milieu. Il est évident que les forces qui viennent d'être évoquées, pourront agir sur les réactions enzymatiques et hormonales par leur influence sur la migration des ligands vers leurs récepteurs.

I - 4 - Interactions enzymatiques - L'action des champs électro-magnétiques peut se manifester également à partir du stade de l'édification du complexe entre l'enzyme et le(s) substrat(s). Les divers types d'interactions électrostatiques pouvant intervenir à ce niveau ont été récemment discutés, dans le cas général de réactions en conditions naturelles, par LUNDSTROEM, I. et NYLANDER, C. (1983, Period. Biol., **85**(suppl. 2), 53-60), ainsi que par LAVERY R. , PULLMAN, A. et WEN, Y.K. (1983,

Int. J. Quantum Chem., 24, 353-371) à propos du rôle des résidus cys -25 et His-159 dans le site actif de la papaïne, par WARSHEL et CHURG (1983, J. Mol. Biol., 168, 693-697) qui ont montré que l'énergie électrostatique associée au transfert d'électrons est très inférieure,à l'intérieur du cytochrome C, à ce qu'elle serait dans l'eau, et par RISTAU, O. (1983, Stud. Biophys., 96, 231-232) qui ont étudié les propriétés magnétiques liées aux variations de spin dans les hémoprotéines ferriques. Enfin, SURCOUF, E. & MORNON, J.P. (1982, C.R. Acad. Sc., 295(II), 923-926) ont émis l'idée d'une véritable "signature de Van der Waals" dans les processus de reconnaissance moléculaires. Une première approche théorique du mode d'action des champs em (VEVE et BOUNIAS, Op. cit.) peut être ébauchée d'une part sous l'angle du processus thermodynamique, et d'autre part, au niveau de la configuration spatiale des sites respectifs de fixation et de réaction, sur l'enzyme. Dans le premier cas, sous l'action d'un champ électrique d'intensité E, l'enthalpie libre de la réaction (ΔG) pourrait varier d'un facteur δ proportionnel à E^2 et au coefficient de HILL (n_H) de la réaction : $\delta(\Delta G) = -2.10^{14}\ n_H\ E^2$ cal.mole^{-1}. En pratique, des variations relatives de l'ordre de 3% sont prévisibles avec des champs de l'ordre de 10^8 V.m^{-1}. Dans le second cas, les récepteurs fixent le ligand au moyen de liaisons de faible énergie (hydrogène, liaisons de Van der Waals, forces de London, énergies dipolaires, et par attractions électrostatiques, hydrophiles ou hydrophobes). Des forces de même nature déterminent également la conformation des sites réactionnels, donc leur activité, qui peut donc être soit augmentée soit diminuée par l'interaction d'un champ électrique qui se comporte alors comme un authentique effecteur "allostérique". Les énergies d'interaction ainsi mises en jeu (U) dépendent de la distance r entre les sites des récepteurs et des ligands. Elles seraient voisines des valeurs maximales suivantes (K.cal.mole^{-1}), r étant exprimé en Å :

liaison hydrogène : $U = -60/r$ entre dipôles : $U = -6{,}25.10^2/r^3$

forces de London : $U = -1{,}5.10^5/r^6$ par dipôles induits : $U = -7{,}8.10^3/r^6$

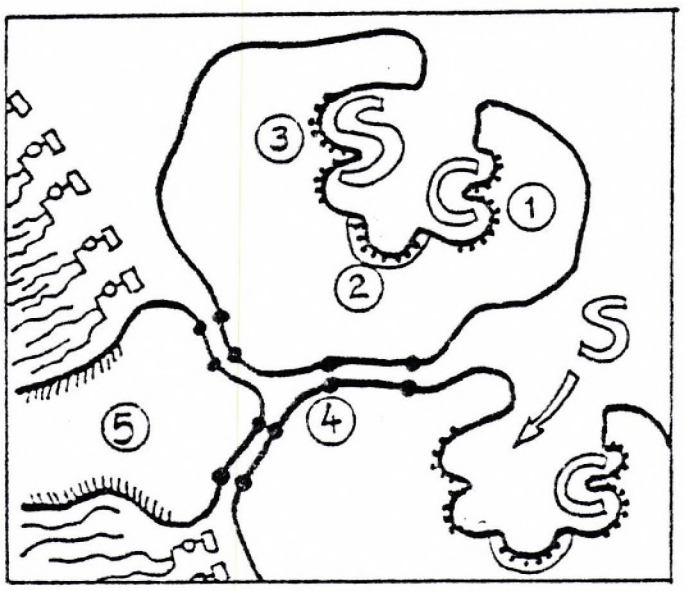


Fig. 37-Conformation schématique d'un complexe enzyme-substrat :
1 : site du co-enzyme
2 : site réactionnel ou site catalytique
3 : site de fixation du substrat
4 : sites d'association des oligomères en complexes fonctionnels
5 : sites de fixation cellulaire de l'enzyme

De fait, des résultats expérimentaux de plus en plus nombreux viennent décrire des modifications apportées aux réactions enzymatiques par les champs em. Les premières synthèses bibliographiques réalisées par WARSHEL, sur ce sujet, portaient sur 9 références en 1979 (Symp. Mol. Struct. Dyn. : Lect. Biol. Chem. Phys., Philadelphia, 297-308) et sur 40 références en 1981 (Acc. Chem. Res., 14(9), 284-290). Ainsi, des augmentations d'activité de transaminases et de phosphatases ont été observées

sous l'action de champs électriques de 50 Hz appliqués sur des rats 4 h par jour pendant 14 jours (WESOLOWSKI, W. et al., 1982, Postepy Fiz. Med., 17(1-2), 53-56) et la même fréquence, provenant de champs magnétiques alternatifs de 32 KA/m, augmente également l'activité de plusieurs enzymes du métabolisme glucidique (KOLODUB F.A. et al., 1980, Gig. Tr. Prof. Zabol. (10), 63-64).

Bien évidemment, le fonctionnement des enzymes membranaires dont l'activité est associée à des transferts ioniques (protons, par exemple) ou de molécules activatrices ou inhibitrices, sera affecté par les champs électriques (SELEGNY, E. et al., 1983, Bioelectrochem. Bioenerg., 10(1), 133-153). Il n'est donc pas surprenant que l'activité des ATPases, par exemple, ait pu être stimulée par la création de différences de potentiels électrochimiques trans-membranaires, à la suite de l'application de champs électriques pulsés (quelques µs à 0,5 et 60 ms) chez E. coli (TEISSIE J., 1983, Stud. Phys. Theor. Chim., 24, 575-582) et dans les chloroplastes de Végétaux (SCHLODDER, E. & WITT, H.T., 1981, Biochim. Biophys. Acta, 635, 571-584).

Par contre, des champs électrostatiques de 2.000 $V.cm^{-1}$ qui augmentent de 51% la concentration des péroxydes lipidiques n'augmentent pas l'activité des superoxyde dismutases (ARTQRUNI, G.G. et al., 1980, Biol. Zh. Arm., 33(11), 1185-1188) et les catalases ne sont pas affectées par des champs magnétiques (AFONIN et al., 1982, Zh. Fiz. Khim., 56(11), 2740-2743) : or nous devons songer, dans ce cas, que le degré d'oxydation du fer (ferrique) contenu au centre du noyau hématinique des péroxydases et catalases **n'est pas modifié** au cours de la réaction : c'est là que pourrait résider la relation de cause à effet !

Enfin, d'autres modes d'action peuvent également intervenir, tels que l'excitation préalable du substrat (ETZLER, F. et al., 1982, Rev. Roum. Biochim., 19, 267-273), le mode d'assemblage des protomères en complexes fonctionnels (BUNN, H.F. & Mc DONALD, M.J., 1983, Nature (Lond.), 306, 498-500), ou encore des modifications de distribution des formes moléculaires, observées sous l'influence de champs électriques de 2.000 $V.cm^{-1}$ (TOVMASYAN, V.S. & KOZLOVA, V.V., 1980, Zh. Eksp. Klin. Med., 20(3), 277-280) ou de champs magnétiques constants de 2950 T (YANEVA, E., et al., 1982, Dokl. Bolg. Akad. Nauk., 37(7), 969-972), appliqués pendant 6 à 24 heures. Conséquence enzymatique inattendue, des champs em liés à des ondes millimétriques (6,48 mm) appliqués pendant 1,5 heures à des cultures de staphyllocoques augmenteraient de 80% leur production de pénicillinase ! (DEVYATKOV, N.D. et al., 1981, Radiobiologiya, 21(2), 163-171).

I - 5 - Interactions hormonales - La fixation des hormones sur leurs récepteurs fait également appel à toute une gamme de liaisons (fig. 4) dont la sensibilité aux champs em ne peut être sans conséquences physiologiques.

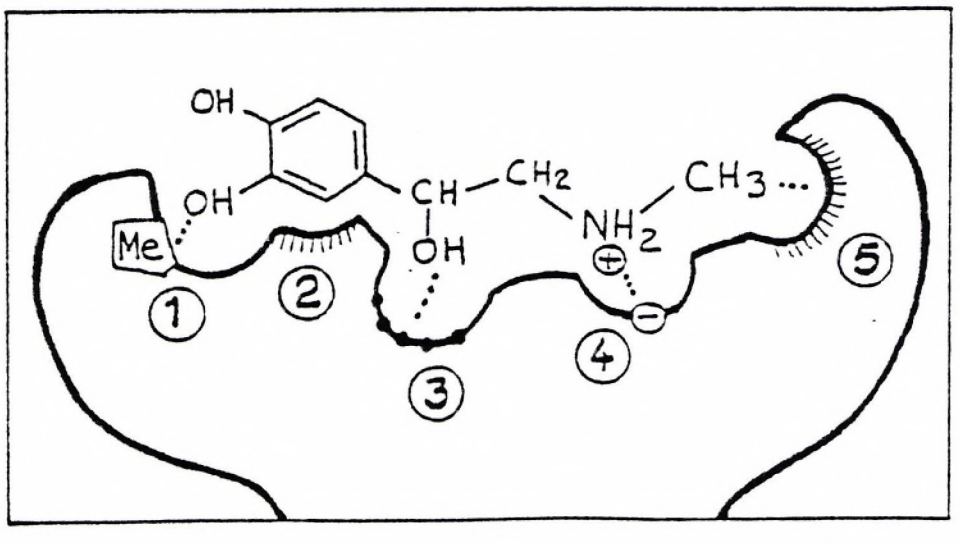


Fig. 38 - Un exemple de liaison entre hormones et récepteur : la fixation de l'adrénaline sur un site de type β

1 site métallique (Me) : chelation
2 site d'affinité hydrophobe
3 liaison hydrogène
4 site anionique (phosphate)
5 site d'affinité hydrophobe

Mais les secrétions hormonales elles-mêmes peuvent être affectées. Des augmentations de concentrations en hormones adrénergiques ont été observées après exposition de souris à des champs magnétiques constants (1,6 T) pendant 30 jours (KLIMOVSKAYA & MASLOVA, 1983, Izv. Akad. Nauk. SSSR. ser. Biol., **4**, 606-609 ; NAKHIL'NITSKAYA, Z.N. et al., 1983, Acta Astronaut., **10**(3), 159-161 ; KLIMOVSKAYA, L.D. et MASLOVA, A.F., 1982, Kosm. Biol. Aviakosm. Med., **16**(6), 71-74), de même que la secrétion d'hydroxy-5 tryptamine est augmentée après exposition à des valeurs de 130, 350 et 1.200 oe (ARISTARKHOV, V.M. et al., 1983, Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Biol., **1**, 111-121), tandis que l'inversion ou l'inclinaison, pendant 24 h, de la composante "horizontale" du champ magnétique naturel, diminue certaines secrétions hypophysaires et activités enzymatiques associées (WELKER, H.A. et al., 1983, Exp. Brain. Res., **50**(2-3), 426-432).

Il est intéressant de constater que l'action d'un champ em de 3.300 ergs s'est avérée très efficace comme anti-inflammatoire anti histaminique chez le rat sain, et même davantage dans le cas d'animaux surrénalectomisés où la cortisone restait sans effet (CHARSKAYA, I.L. et ALYAKRITSKAYA, S.Y., 1981, Farmakol. Regul. Regener. Protsessov Eksp. Klin., 177-182, Ed. G.L. Bilitch et al.).

La secrétion d'insuline induite par hyperglycémie provoquée est réduite de 35%, de même que la sortie de l'ion Ca^{++}, dans des ilots pancréatiques exposés pendant 18 h à un champ em pulsé de basse fréquence (JOLLEY, W.B. et al., 1983, Bioelectromagnetics, **4**(1), 103-106).

Enfin, l'activité de l'adénylate cyclase (enzyme localisée sur des membranes) et les concentrations en AMP cyclique sont souvent modifiées par des champs électriques, avec une réponse différentielle en fonction des intensités (fig. 5), de même que par des champs magnétiques constants (KATOLA, V.M. et al., 1981, Kosm. Biol. Aviakosm. Med., **15**(4), 50-52 : 26,3 A/m) ou pulsés (FITTON-JACKSON, S. & BASSETT, C.A.L., 1980, Tissue Cult. Med. Res., **2**, 21-28).

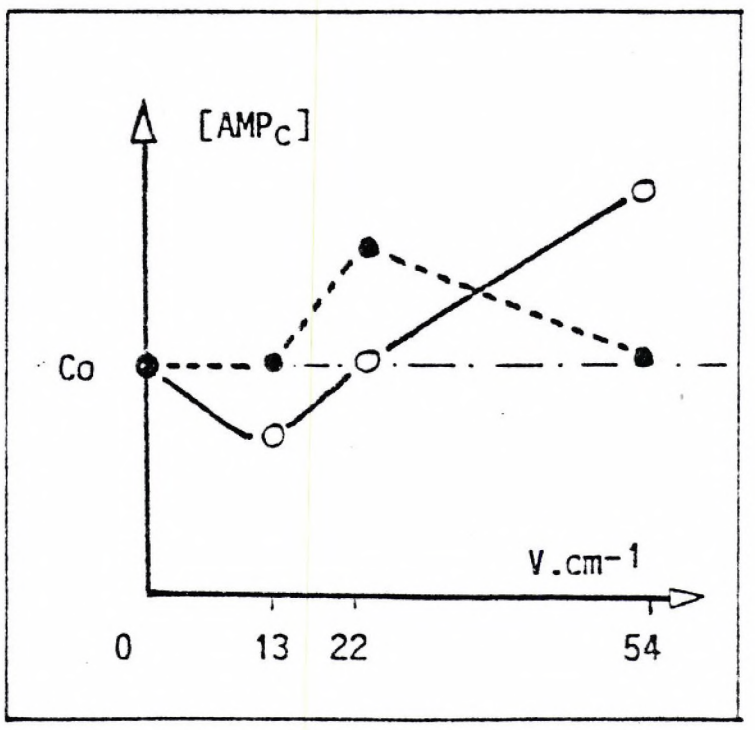


Fig.39- Variations des concentrations en AMPcyclique dans des cellules condylaires (●--) et embryonnaires (o—) de rats exposés à diverses valeurs de champs électriques (Co=valeur normale). (SHIMSHONI, Z. et al., SOMJEN, D. et al., 1982, Int. Congr. Ser., Excerta Med., 589, 423-426).

Il convient de noter, également, que selon KHAZHAKHYAN, L.V. et KHACHATURYAN, S.K. (1982, Deposited doc., VINITI, 3884-82, 13 pp.) des champs magnétiques auraient une action "intensité-dépendante" sur le mode d'association des molécules telles que : drogues/récepteurs, auquel il conviendrait, nous semble-t-il de relier les très nombreux effets "périphériques" observés, après avoir procédé à une minutieuse classification des divers paramètres de champs qui ont été appliqués. Il s'avère, en effet (fig. 5), que des relations "doses/effets" polyphasiques peuvent apparaître, comme dans la pharmacologie "chimique" ainsi que dans bon nombre de mécanismes naturels de régulation (fig. 6).

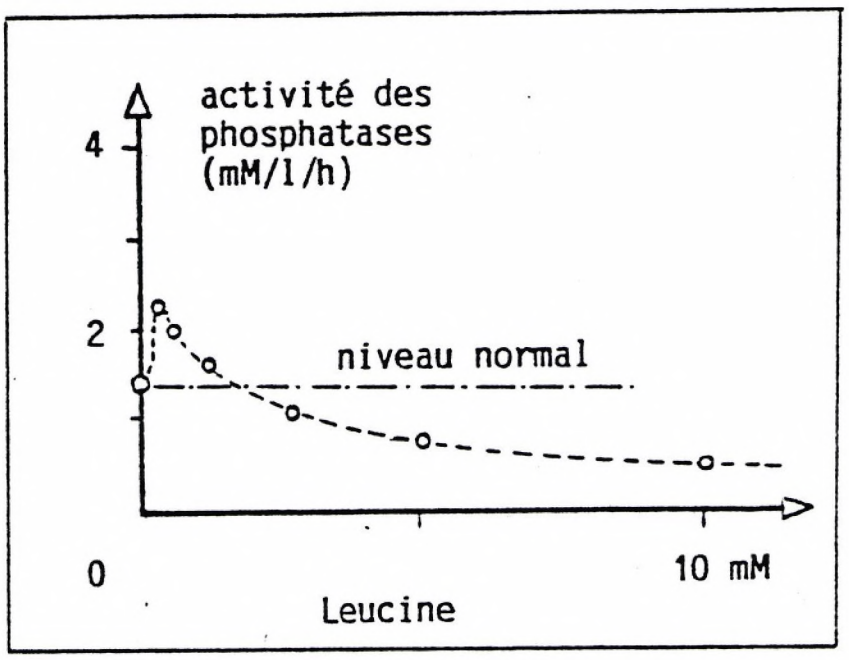


Fig.40- Double aspect des relations doses/effets dans les mécanismes naturels : ici, contrôle ''allostérique'' des phosphatases foliaires par la L. Leucine (BOUNIAS, M. et PACHECO, H., 1972, C.R. Acad. Sc., 275D, 201-204)

I - 6 - La photosynthèse - L'appareil photosynthétique fait essentiellement appel à des transferts d'énergie de photons à électrons puis à des "pompages" de protons et à des transferts d'électrons entre co-facteurs oxydo-réductibles. Tous ces processus, auquel il convient d'ajouter le rôle des membranes, dans lesquelles se déplacent les chromoprotéines impliquées (JORDAN, B.R. et al., 1983, Biochim. Biophys. Acta, **725**, 77-86), sont a priori sensibles à l'action des champs em.

Si de nombreux travaux expérimentaux ont porté, jusqu'ici, sur des organismes primitifs (procaryotes photosynthétiques), le calcul théorique permet de prévoir, par exemple au niveau de la chlorophylle A des végétaux évolués (eucaryotiques), divers types d'effets liés à la "désexcitation" de l'état triplet de la molécule, avec "effet stark" dans un champ électrique $\vec{E}$ ou "effet Zeeman" dans un champ magnétique $\vec{B}$ (VEVE et BOUNIAS, 1982, op. cit., pp. 48-53). Dans le premier cas, le champ $\vec{E}$ peut provoquer une "levée de dégénérescence" des niveaux énergétiques (avec multiplication des niveaux) à laquelle peut s'ajouter, dans le cas d'un champ très intense, un phénomène d'ionisation : la difficulté est, ici, de transférer au cas d'une molécule très complexe, les données applicables à des atomes simples. Dans le second cas, il pourra se produire également une multiplication des niveaux d'énergie de la molécule excitée, sous l'action d'une induction magnétique produite par le champ $\vec{B}$. Sous l'action de champs magnétiques intenses, le phénomène s'écarterait de l'"effet Zeeman" pour se rapprocher de l'"effet Paschen-Back".

Expérimentalement, l'action de champs magnétiques (de l'ordre de moins de 1 KG, ou de 1 et 1,5 jusqu'à 14 KG) agit dès le stade de la captation d'énergie des photons par l'"antenne" photosynthétique de bactéries (Mc GANN, W.J. & FRANK, H.A., 1983, Biochim. Biophys. Acta, 725, 178-179 ; FRANK, H.A. et al., 1982, Biophys. Biochem. Res. Comm., 106(4), 1310-1317). Cela se traduit au niveau du centre réactionnel sur la conformation des molécules "pièges" (LERSH & MICHEL-BEYERLE, 1983, Chem. Phys., 78, 115-126) et sur l'état d'excitation sous forme "triplet" de leurs électrons (CHIDSEY C.E.D. et al., 1980, Chem. Phys. Lett., 74 (1), 113-118) (ELFIMOV, E.I., 1983, Biol. Krugovorot Veshchetsv. Energ. Sist. Pochva-Rast., p. 12-16, Ed. Gaziev., Akad. Nauk. SSSR).

L'action de champs électriques se manifeste également au niveau de la photo sensibilité des bactériorhodopsines, (chromoprotéines caroténoïdiennes), d'une part dans les transferts électroniques, sous 5.10^7 V.m^{-1} (CHAMOROVSKII, S.K. et al., 1983, Biochim. Biophys. Acta, 725, 403-406) et d'autre part sous forme de changements structuraux liés à des créations, par des champs pulsés (1 à 100 µs) de 1 à 30.10^5 V.m^{-1}, de moments dipolaires induits de l'ordre de 10^{-25}c.m soit $3,3.10^4$ Debye (avec $1,3.10^5$ V.m^{-1}) (TSUJI, K. & NEUMANN; E., 1983, Biophys. Chem., 17 (2), 153-163).

I - 7 - Le code génétique - La structure de l'ADN en chaînes hélicoïdales comportant, en alternance, des bases puriques ou pyrimidiques, et des liaisons phosphate, toutes de forte polarité, séparées par le pentose, est en elle-même, génératrice de potentiels et de champs électrostatiques, dont l'étude fait l'objet de toute une série de travaux par LAVERY, R., PULLMAN, B., & PULLMAN, A., 1982 (Theor. Chim. Acta, 62(2), 93-106) et 1983 (Biophys. Chem., 17(1), 75-86). Il en est de même pour les ARN$_t$ (PULLMAN, B., 1983, Stud. Biophys., 96(3), 165-170) et les auteurs ont analysé également l'interaction des champs électrostatiques engendrés dans les nucléotides, avec leur hydratation (LAVERY, R. & PULLMAN, B., 1982, Stud. Biophys., 92, 99-110), ce qui touche un aspect à la fois très important, mais également difficile à étudier, des relations moléculaires intra cellulaires : l'hydratation des molécules, au même titre que celle des ions, est, en effet, susceptible d'influer également sur leur mobilité, indépendamment de la valeur de la constante diélectrique du milieu qu'elles traversent (LUNDSTROEM, I. & NYLANDER, C., 1983, Int. J. Quantum Chem., 23(4), 1269-1282).

Déjà en 1979, IIZUKA (Polym. Prep., ACS-DPC, 20(1), 78-81) attirait l'attention sur le fait que ce type de macro-molécule pouvait être déformé par des champs électrostatiques ou magnétostatiques, même faibles, jusqu'à la formation éventuelle de "cristaux liquides". En 1982, BALANOVSKI, E. & BEANCONSFIELD, P. (Phys. Lett. A, 93A(1), 52-54) suggèrent que des champs em externes non linéaires peuvent interagir avec le transfert d'information le long de la chaîne d'ADN, tandis que GOODMAN et al. (1983, Science (Wash.), 220(4603), 1283-1285) montrent que des champs em pulsés (par pulsions simples ou trains d'ondes) agissent sur la transcription par l'intermédiaire des ARNm. Les concentrations en ARN et en ADN sont accrues chez des rats exposés en continu à des sources magnétiques de 200 oe (BRUVELE, M. et al., 1980, Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis, 8, 121-124) et à des champs magnétiques pulsés (50 Hz 7,5 KA.m^{-1}) dont l'action abaisse, parallèlement, les concentrations en glucose et ATP, comme dans le cas de champs de 32 KA.m^{-1} (KOLODUB, F.A. et al., 1980, Gig. tr. Prof. Zabol.).

Indirectement, les champs em vont donc pouvoir interagir avec les mécanismes de la mutagénèse, et il a été montré, chez des levures, que leurs effets peuvent se traduire par une forte diminution (22 fois) des taux de mutations associée à une augmentation importante (jusqu'à 35 fois) de la survie de cellules incubées dans un milieu contenant des mutagènes chimiques tels que la nitrosoguanidine (KHAZAKYAN, L.V. et al., 1982, Biol. Zh. Arm., **35**(9), 735-738 ; DANILENKO, I.I. et al., 1983, Elektron. Obrab. Matter., **5** 79-83).

Les mécanismes moléculaires par lesquels se manifestent de tels résultats sont encore mal connus ; ainsi, dans des cultures de cellules cancéreuses où la synthèse d'ADN est inhibée par l'ATP et par les adénylate-cyclases, les champs em pourraient agir indirectement en levant l'inhibition soit par stimulation des ATPases, soit par blocage des adénylate-cyclases (COLACCIO, G. & PILLA, A.A., 1983, Bioelectrochem. Bioenerg., **10**(1), 119-131).

Les manifestations de l'action des champs em à divers niveaux des processus qui conduisent de la transcription à la traduction, aboutissent parfois à de curieux résultats : ainsi, l'application de champs à très haute fréquence à des surrénales de rat se traduit par une déviation préférentielle de la biosynthèse des immunoglobulines en faveur des formes non spécifiques, ce qui aboutit à un effet "immuno suppresseur" (PERSHIN, S.B., et al., 1983, Zh. Mikrobiol. Epidemiol., Immunobiol., 6, 88-91).

I - 8 - Effets moléculaires et périphériques - Il apparaît, au terme de ce bref tour d'horizon, que l'action des champs em va se manifester en premier lieu sur certaines cibles primaires par des effets inter ou intra-moléculaires dont il sera possible, selon les cas, d'observer également les conséquences biochimiques ou physiologiques "périphériques". Ainsi, des travaux très ponctuels ont été effectués par HUDRY-CLERGEON, G. et al., sur l'orientation de structure de la fibrine par les champs magnétiques (1980, Protides Biol. Fluids, **28th**, 317-320 ; 1981, Nature (London), **289**(5793), 91-93 ; 1983, Ann. N.Y. Acad. Sci., **408**, 380-387), ou par ROBINSON, K.R. et Mc CAIG, C., 1980 (Ann. N.Y. Acad. Sci., **339**, 132-138) sur l'influence de champs électriques (0,07 à 0,35 $V.cm^{-1}$) sur la croissance et l'orientation des cellules nerveuses. Inversement, CLEARY, S.F. et al. (1980, Bioelectromagnetics, **1**(3), 345-352) puis KOLODUB, F.A. et al., (1981, Kardiologiya, **21**(4), 82-85) ont respectivement décrit les effets de champs em pulsés (10-38 Hz, 1-2 $KV.cm^{-1}$, 0,4 µs) et constants (50 Hz, 7,5 et 32 $KA.m^{-1}$) sur un grand nombre de composés métaboliques et d'enzymes, sans pouvoir en tirer, semble-t-il, de conclusions cohérentes.

Il convient de souligner, pour terminer, qu'un début d'orientation de l'utilisation des champs électromagnétiques se manifeste vers le domaine des "biotechnologies" : ainsi, MARTIN, G.A. (1981, Ciencias (Madrid), **46**(3-4), 215-225) triple la production d'amino-acides et de protéines par Azotobacter, en soumettant les cultures à l'action de champs électriques de 1 à 2 Hz, tandis que ADAMKIEWICZ, V.W. et PILON, D.R. (1983, Can. J. Microbiol., **29**(4), 464-467), observent que la synthèse des polyholosides chez streptococcus est liée à l'orientation du support des cultures, par rapport au champ em naturel, ce qui permet de l'accroître (jusqu'à + 66 %) avec un seuil de saturation vers 1,7 G. L'application de champs em à des moûts pourrait même améliorer la qualité des vins, selon DANDAMAEV, G. Sh. et al., (1982, Biokhim. Otd Tipov Vin, **4**, 47-55) ! ...

VIII - PROJETS DE RECHERCHES

I - INDUCTION ENZYMATIQUE.

La comparaison des activité pNP α-D glucosidasiques déterminées par induction "croisée" par hyper tréhalosémie et hypersaccharosémie se poursuit :

le calcul précis des paramètres non michaëliens est en cours, avec utilisation comparative d'une méthode itérative expérimentée sur ordinateur par le Dr. MORGAN, et des méthodes algébriques rigoureuses de BOUNIAS (1978) et de ENDRENYI et coll. (1979).

Il serait également souhaitable de pouvoir analyser l'activité résiduelle tréhalasique des formes moléculaires de type saccharasique telles qu'elles apparaissent au delà de 1 semaine d'induction (apparemment) spécifique par la saccharose.

II - SPECIFICITE MOLECULAIRE ET CINETIQUE ENTRE SUBSTRATS OSIDIQUES ET OSIDASES.

Il serait important de pouvoir procéder dans un proche avenir aux expérimentations suivantes :

a) Détermination des paramètres cinétiques et des formes moléculaires d'activité tréhalasique et saccharasique (spécifiques) en présence d'inhibiteurs de la résonnance du noyau imidazole.

b) Détermination des paramètres cinétiques α-glucosidasiques après action d'agents réducteurs des ponts disulfure (dithiothréitol)

c) Détermination de l'évolution des formes moléculaires en milieu non dénaturant, en présence de fortes concentrations de tréhalose ou de saccharose.

d) Isolement et purification des diverses formes moléculaires, détermination de leurs propriétés cinétiques respectives. Essais de reconstitution des complexes fonctionnels à partir des protomères et des

substrats : comparaison de leurs propriétés à celles des complexes naturels.

La confirmation des mécanismes pressentis permettant à un substrat d'agir sur la structure finale d'un complexe enzymatique auquel il lui confère la spécificité nécessaire, serait bien évidemment d'une très grande importance pour la compréhension des processus qui ont conduit de la matière organique aux protobiontes "viables".

Ce projet a été proposé comme sujet de thèse d'Etat à Mademoiselle Catherine PASQUET, titulaire d'un excellent Doctorat de 3e cycle en Biochimie, qui n'a malheureusement pas pu obtenir la moindre bourse, malgré l'intérêt, à la fois fondamental et appliqué du sujet qui débouchait sur l'étude des médicaments anti-diabétiques oraux.

Document proposé à la suite de l'appel d'offres du M.I.R. :

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE ET DE LA RECHERCHE
Programme Mobilisateur, Essor des Biotechnologies
Pavillon Joffre - Pièce J 015
1, rue Descartes - 75231 PARIS CEDEX 05

N° d'enregistrement :

DECLARATION D'INTENTION

CONSULTATION : Extraction et purification de molécules biologiques

- Thème choisi : thème n°1 : exploitation de réactions Enzyme-substrat
- Titre du projet : purification et propriétés associatives des α-glucosidases (Abeille/HOMME)

ORGANISME DEMANDEUR

- Nom : Institut National de la Recherche Agronomique
- Forme juridique : Etablissement Public à caractère scientifique et technique
- Adresse, Téléphone : 149, rue de Grenelle, 75341 Paris cédex 07
  Centre de Recherches d'Avignon : Domaine St Paul, BP 91, 84140 Montfavet

LABORATOIRE

- Intitulé : Laboratoire de Biochimie (Dépt. de Phytopharmacie)
- Responsable (qualité) : Michel BOUNIAS, Docteur ès Sciences - Maître de Recherche
- Effectifs année en cours : Chercheurs : 1 Ingénieurs : 0 Techniciens : 2
- Budget de fonctionnement prévisionnel pour l'année en cours : Fonctionnement : 70000
  Equipement : demandé : 120.000

RESPONSABLE SCIENTIFIQUE DU PROJET

- Nom, prénom : BOUNIAS Michel
- Qualité : Docteur ès Sciences - Maître de Recherche - Correspondant National de la Société de Biologie.
- Adresse, Téléphone : Laboratoire de Biochimie, Centre de Recherche d'Avignon, BP 91, Domaine St Paul, 84140 Montfavet - (90)88.91.45

COUT DU PROGRAMME (T.T.C.)

	Coût total	Aïde sollicitée	Autres participation
Fonctionnement	10.000	-	Budget INRA
Equipement	140.000	70.000	Budget INRA
Total	150.000	70.000	

DUREE : 2 ans

RESUME

DU PROGRAMME DE RECHERCHES

(taper en simple interligne)

A - OBJECTIFS

- aspect . . fondamental : séparation et purification des différentes formes moléculaires composant le complexe des α-glucosidases de l'hémolymphe ; étude de leur masse molaire et de leurs propriétés cinétiques à l'état individuel ou re-associé.
- aspects orientés : épreuve d'inhibiteurs pharmacologiques (lutte contre les diabètes). Nutrition artificielle de l'Abeille.

B - SITUATION ACTUELLE DU PROJET

Les α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles se distinguent par leurs cinétiques à coopérativité variable (négative ou positive) en fonction des effecteurs ou des substrats en présence. Des études cinétiques expérimentales et théoriques suggèrent que diverses formes moléculaires s'associent en complexes fonctionnels en adaptant leurs propriétés et leur spécificité en fonction des besoins physiologiques (induction consécutive au nourrissement artificiel par substrats d'origine industrielle)

C - PROGRAMME SOMMAIRE DES TRAVAUX

Fractionnement moléculaire en 3 étapes par chromatographies successives sur tamis moléculaires avec et sans radicaux osidiques, puis électrofocalisation. Propriétés cinétiques des fractions isolées. Essais de réaggrégations des formes moléculaires impliquées dans les mécanismes d'inhibition et au cours des processus d'induction, évoqués en A et B. Etude comparée chez les enzymes de l'Abeille et de l'homme, en raison de leurs convergences de mécanismes cinétiques déjà constatées. (BOUNIAS, 1982 : Biochem. Pharmacol., 31, 2769-2775).

Annexes : . la liste des publications significatives du laboratoire avec références et titres pour les 3 dernières années, tapée en simple interligne : 37 Réf. jointes au /dossier
. la liste nominative des participants (chercheurs, techniciens)
. les collaborations extérieures (éventuellement)

LISTE DES PARTICIPANTS

CHERCHEURS : Dr. M. BOUNIAS (M.R.)
TECHNICIENS: Mme DAURADE (3B)
Mme BARESTE (5B)

COLLABORATIONS EXTERIEURES :

Dr. M.R.J. MORGAN : Université de Lancaster (GB)
Drs. HILLEBRAND, TRUSCHEIT, PULS et FROMMER (Instituts de Pharmacologie BAYER, Wuppertal-RFA)
Université de Marseille : Faculté de Médecine.

III - ACTION DES CHAMPS ELECTRO-MAGNETIQUES SUR LES FONCTIONS BIOCHIMIQUES DE L'ETRE VIVANT.

A la suite des contrats n°80-0796 et 83-009 passés entre le CNES et l'INRA, une suite a été proposée au CNES sous forme d'une demande d'attribution de bourse de thèse dont l'intérêt était accru par une double finalité :

a) analyse de l'hypothèse radiative, pour tenter d'interpréter de manière plus approfondie les résultats de "l'affaire de Trans-en-Provence".

b) Recherche de mécanismes de contrôle de type pharmacologique permettant de caractériser les conditions optimales d'application favorable des champs électro-magnétiques à l'agriculture.

Un premier projet, soumis au CNES, est présenté à la fin de la troisième partie (Biochimie Phytosémiologique).

Deuxième Partie

BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE ET CRYPTO TOXICOLOGIQUE

Ce secteur d'activité vise deux objectifs essentiels :

a) Thanatologie : recherche des symptômes biochimiques caractéristiques des seuils de réversibilité de l'évolution physiologique de l'Insecte vers la mort. L'intérêt toxicologique évident se double d'une incidence possible dans le domaine de la mise en évidence des conditions d'apparition de phénomènes de résistance.

b) Cryptotoxicologie : nous proposons, sous ce néologisme, la caractérisation biochimique des manifestations toxicologiques non perceptibles par les voies de l'observation ni, a fortiori, par celles des mesures de létalité, consécutives à l'action de très faibles doses, non détectables dans les individus intoxiqués.

L'intérêt de ce genre d'étude réside en particulier dans la mise en évidence possible de manifestations conjuguées (synergie "négative") de l'action d'un agent toxique agrochimique et d'autres facteurs (non létaux en eux-mêmes) de type pathologique ou climatique, par exemple ; chacun de ces facteurs agissant isolément peut s'avérer sans incidence grave alors qu'associés, ils peuvent être à l'origine de certaines diminutions de cheptel apicole récemment constatées de plus en plus fréquemment mais restées inexpliquées.

Le même principe peut s'appliquer dans plusieurs directions : la protection toxicologique d'un auxiliaire, la lutte contre un parasite, ou l'étude de manifestations strictement pathologiques.

Le laboratoire a apporté une contribution dans chacun de ces cas

1 Protection de l'Abeille : action de la deltamethrine
2 Lutte contre Aedes par la toxine du Bacillus thuringiensis (thèse de Doctorat de M. NIZEYIMANA)

3) Pathologie du Gryllus (thèse de Doctorat de Mme BOULBES-DACLINAT).

Le support biochimique proposé par le laboratoire pour ces recherches se situe au niveau de l'équilibre métabolique des glucides et des lipides, d'importance majeure en tant que sources d'énergie, et plus précisément de la régulation de leurs transferts des sites biosynthétiques (tissus adipeux + intestin) au milieu de transport (hémolymphe) vers les sites d'utilisation (muscles thoraciques).

I - ACTION DE LA DELTAMETHRINE A DOSE INFRALETALE SUR LA GLYCEMIE ET LA LIPEMIE DE L'ABEILLE. (M. BOUNIAS, N. DUJIN et D.S. POPESKOVIĆ)

Ce travail s'incrit dans le cadre du programme de collaboration franco-yougoslave au cours duquel le laboratoire de biochimie a reçu à plusieurs reprises des chercheurs de Belgrade en stages de formation.

Le manuscrit soumis pour avis au Professeur DOWNER (Waterloo, Canada) a reçu une approbation en termes sans équivoque ("enthusiasm").

Il a été soumis et accepté par la revue "Pesticide Biochemistry and Physiology", éditée par Acad. Press.

La fig. 41 illustre les perturbations observées au niveau de la lipémie sous l'action de 100 femtomoles par abeille (c'est à dire 6.10^{10} molécules). Un projet de recherches couplées avec l'étude des symptômes biochimiques de la varroose a été proposé au Ministère de la Recherche pour l'obtention d'une bourse de thèse et à la CEE dans le cadre d'un appel d'offres. (Voir chap. IV). Aucun n'a eu de suite.

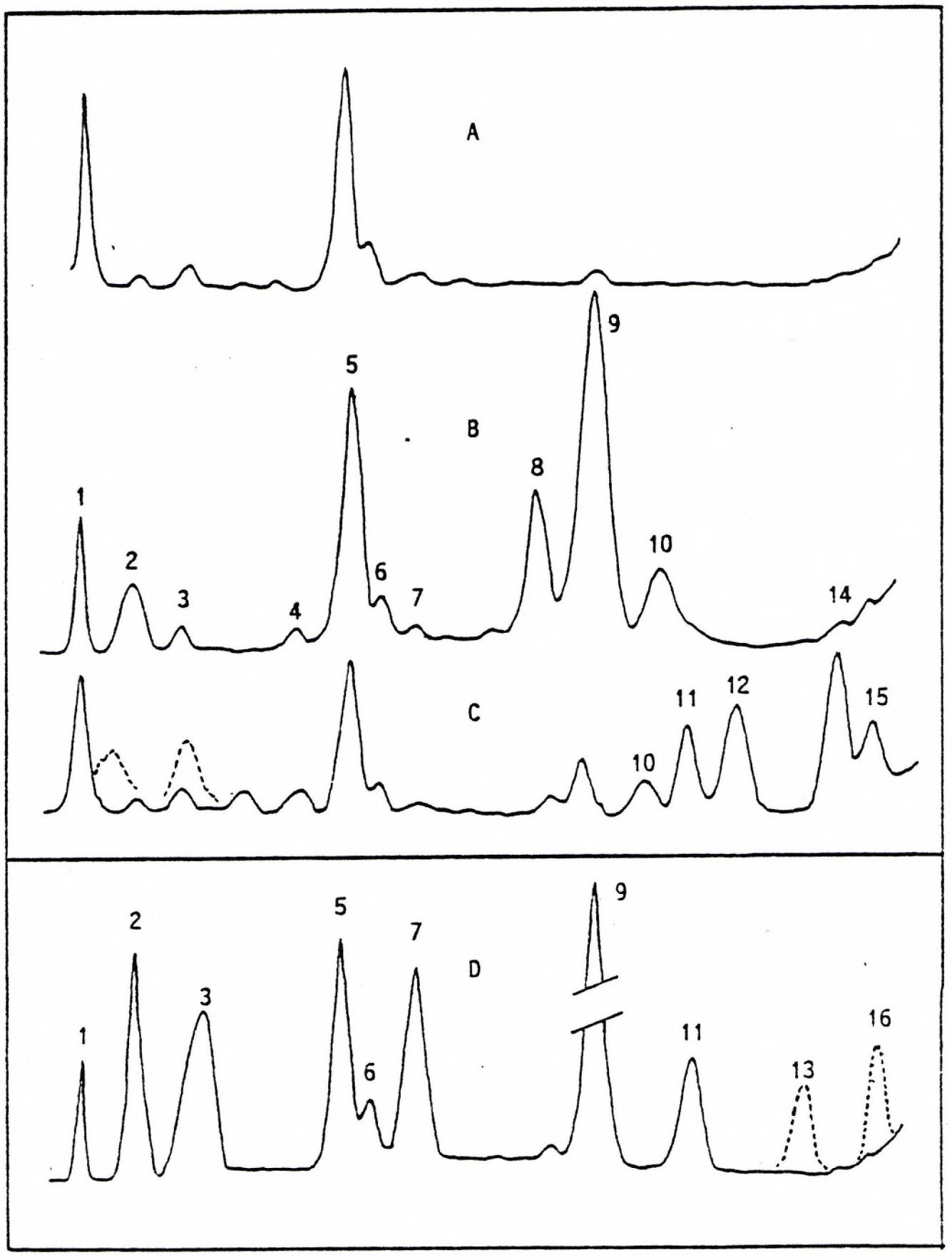


Fig. 41 - Chromatogramme des lipides de l'hémolymphe d'Abeilles témoins (A) ou 2h30 à 3h après injection de deltaméthrine (B) et (C) - (D) : chromatogramme étalon.

1 = PL ; 2 = MG ; 3 = AG (C16-C18) ; 4 = AG longs (≥C20) ; 5 = St ; 6 = DG 1-2 ; 7 = DG 1-3 ; 8 = TG courts (<C16) ; 9 = TG normaux (C16-C18) ; 10 = TG longs ; 11 = EAG ; 12 = Cérides courts ; 13 = Cérides C12xC16 ; 14 = cérides moyens ; 16 = Cérides C22xC20.

II - ACTION DE LA TOXINE DU BACILLUS THURINGIENSIS SUR LA GLYCEMIE, L'AMINO-ACIDEMIE ET LES LIPIDES ABDOMINAUX DE AEDES.

(B. NIZEYIMANA & M. BOUNIAS)

Ce travail constitue la thèse de Doctorat de M. NIZEYIMANA, inscrit à l'Université de Montpellier en 3e cycle de parasitologie (Professeur C. VAGO), avec pour rapporteur Universitaire de thèse M. VIVARES.

Au cours de ces recherches, (maintenant terminées et en fin de rédaction), un certain nombre de concepts proposés depuis plusieurs années par le laboratoire ont pu être mis en application :

1 - Comparaison de l'action de doses infra létales à supralétales, stades d'agonie inclus. (0,1 ; 0,2 ; 1 ; 10 mg de toxine par titre)
2 - Etablissement de relations fonctionnelles entre composants des différentes classes biochimiques (étude statistique).
3 - Modifications comparées des équations respectives des relations fonctionnelles obtenues avec les différentes doses.
4 - Identification des chaînons métaboliques concernés et aboutissement à une hypothèse cohérente quant à la "cible" primaire possible de la toxine.

Comme toujours, aucun détail numérique ne saurait être communiqué dans un rapport avant la soutenance. Qu'il soit simplement permis de préciser que quelques 10.500 analyses numériques auxquelles s'ajoutent 80 figures, ont permis de répondre à chacun des 4 objectifs précisés ci-dessus.

(Soutenance prévue pour mars 1985).

III - ACTION COMPAREE D'UNE RICKETTSIOSE ET DU JEUNE SUR LES GLUCIDES ET LES LIPIDES DE L'HEMOLYMPHE ET DU TISSU ADIPEUX DE GRYLLUS BIMACULATUS. (B. BOULBES-DACLINAT, C.P. VIVARES et M. BOUNIAS).

Ce chapitre concerne la thèse soutenue le 2 mai 1984 par Madame BOULBES-DACLINAT à l'Université de Montpellier (jury : MM. L. EUZET, Président, C. VAGO, Membre de l'Institut,

M. BOUNIAS et C.P. VIVARES).

Les perturbations biochimiques provoquées par la rickettsiose ont été comparées à celles observées au cours du jeûne expérimental. C'est sur ce dernier point, à rapprocher des recherches similaires également poursuivies chez l'abeille, que seront indiqués quelques uns des résultats initiaux dont une analyse plus approfondie est actuellement en cours.

A - Les glucides - Les résultats sont indiqués dans le tableau 38

Tableau 38 - Evolution comparée de la glycémie et de la composition glucidique du tissus adipeux de Gryllus bimaculatus au cours du jeûne. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (S_x) sont donnés pour (N) déterminations.

Temps : paramètres :	0(Témoins) $\bar{x}$ (N) S_x	3 jours $\bar{x}$ (N) S_x	5 jours $\bar{x}$ (N) S_x	7 jours $\bar{x}$ (N) S_x	10 jours $\bar{x}$ (N) S_x
Hémolymphe (mM)					
Tréhalose	3,5 (8) 2,2	1,5 (2) 0,7	3,4 (2) 0,1	0,8 (2) 0,4	1,0 (2) 0,5
Glucose	7,4 (8) 3,1	2,4 (2) 0,4	5,5 (2) 0,5	2,7 (2) 0,4	4,7 (2) 0,4
Tissus adipeux (nmoles.mg^{-1})					
Tréhalose	2,9 (7) 0,9	0,45 (2) 0,17	3,1 (2) 0,4	1,24 (2) 0,28	2,2 (2) 0,7
Glucose	11,6 (5) 4,4	1,5 (3) 0,4	2,14 (2) 1,4	1,0 (2) 0,5	2,2 (2) 0,4

Ce tableau appelle un certain nombre de remarques.

◊ La première concerne les proportions relatives du tréhalose et du glucose : ce dernier est le plus concentré, contrairement à ce qui est observé chez l'abeille et de nombreux autres insectes. En outre, le tissus adipeux n'est plus riche qu'en glucose, et ce, seulement chez les Témoins. Toute les séries expérimentales ayant été conduites dans des périodes comprises entre Mai et Juin, des animaux témoins ont été ensuite analysés à l'automne (Septembre-Octobre).

Les résultats obtenus sont alors totalement différents, et plus conformes aux normes habituelles pour la plupart des insectes (tableau 39).

Tableau 39 - Les glucides du Grillon à l'automne : nmoles par µl (Hml) ou par mg (TA).

Tissus	Tréhalose $\bar{x}$	(N)	σ_x	Glucose $\bar{x}$	(N)	σ_x
Hémolymphe	42,0	(3)	3,0	2,4	(2)	0,1
Corps adipeux	124,0	(3)	24,3	4,7	(3)	0,3

Est-ce à dire que la période du printemps constitue, chez le Grillon, une phase de perturbations physiologiques ? ...

◊ Le Grillon est beaucoup plus résistant que l'abeille à l'épreuve du jeûne. Il convient toutefois de noter une analogie dans les cinétiques de variations, avec un rétablissement -au moins partiel- au 3e jour (chez l'abeille : 21h et 30h successivement). Mais tandis que chez le Grillon la glucosémie reste alors très inférieure au niveau initial, elle le dépasse chez l'abeille. Ces écarts pourraient être liés au problème de l'influence de la période de l'année.

◊ Certaines corrélations fonctionnelles peuvent être déduites des résultats dans le tableau 38. Quelques paramètres statistiques en sont regroupés dans le tableau 40.

Tableau 40

Composés en corrélation	ρ(N=5)	t	P(ρ)	a	b	σ_b
Glc-Hml / Tre-Hml	0,806	2,36	0,09	1,95	1,27	0,54
Glc-TA / Tre-TA	0,528	1,08	0,36	-0,456	2,095	1,69
Tre-TA / Tre-Hml	0,743	1,92	0,15	0,32	0,87	0,45
Glc-TA / Glc-Hml	0,826	2,50	0,088	3,13	0,384	0,15
Tre-TA / Glc-Hml	0,903	3,64	0,035	1,25	1,66	0,52

Il y a donc corrélation positive entre les concentrations de l'hémolymphe et celles du tissus adipeux, comme entre celles du glucose et du tréhalose. Il est à remarquer que la meilleure corrélation relie le glucose de l'hémolymphe au tréhalose du tissus adipeux.

Il aurait été permis de penser que les réserves du tissus adipeux s'épuisent progressivement pour maintenir la glycémie à un niveau plus homogène : une telle hypothèse semble partiellement confirmée pour le glucose seulement, dont la variance globale est le 3,418, dans l'hémolymphe, pour une moyenne de 4,54 mM soit 61% de la valeur initiale (C.V. = 0,407) alors que dans le tissus adipeux la variance atteint 15,84 pour une moyenne de 3,688 mM (C.V. = 1,079), c'est-à-dire 31% de la valeur initiale.

Les variations de concentrations en tréhalose ne permettent pas de conclure.

B - Les lipides - Les résultats numériques sont indiqués dans le tableau 41.

Tableau 41 - Evolution comparée de la lipémie et de la composition lipidique du tissus adipeux de Gryllus bimaculatus au cours du jeûne. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (S_x) sont donnés pour (N) déterminations et exprimés en µg par µl d'hémolymphe ou mg de tissus.

Temps : paramètres	0(Témoins) $\bar{x}$ (N) S_x	3 jours $\bar{x}$ (N) S_x	5 jours $\bar{x}$ (N) S_x	7 jours $\bar{x}$ (N) S_x	10 jours $\bar{x}$ (N) S_x
Hémolymphe :					
Phospho-lipides	2,30 (7) 1,07	0,26 (2)	0,13 (2) 0,04	0,66 (2) 0,04	0,17 (2) 0,03
Acides gras	0,045(4)0,010	0,0025(2)0,0005	Traces	Traces	Traces
Diacyl 1-2 glycérols	0,060(5) 0,022	Traces	0,007(2) 0,003	Traces	0,056(2) 0,02
Diacyl 1-3 glycérols	⩽ 0,008	0,01 ...	0,1 (2) 0,04	Traces	0,06 (2) 0,03
Triacyl-glycérols	1,17 (6) 0,67	0,05 ...	Traces	0,002 ...	Traces
Stéroïdes libres	0,011(3) 0,002	0,027(2) 0,005	0,01 (2) 0,005	Traces	0,015(2) 0,002
Tissus adipeux :					
Phospho-lipides	20.6(5)14,0	10,4 (2) 5,2	23,5 (2) 4,2	3,6 (2) 0,2	24,9 (2) 0,4
Acides gras	1,16(3)0.65	0,05 (2) 0,006	1,74 (2) 0,14	0,20 (2) 0,03	1,25 (2) 0,25
Diacyl 1-2 glycérols	0,38(5)0,31	Traces	1,74 (2) 0,34	Traces	0,75 (2) 0,34
Diacyl 1-3 glycérols	0.69(3)0.58	Traces	1,9 (2) 1,1	Traces	1,7 (2) 1,0
Triacyl-glycérols	58.4(5)25,8	87,2 (2) 8,4	29,5 (2)13,1	38,5 (2)12,5	39,6 (2)15,0
Stéroïdes libres	1,34(5)0.46	0,48 (2) 0,09	2,9 (2) 0,1	0,5 (2) 0,3	2,3 (2) 0,2

◊ Le premier élément qui retient l'attention est l'accumulation des lipides du grillon dans le corps adipeux où ils sont 23 fois plus concentrés que dans l'hémolymphe (alors que chez l'abeille adulte, ce rapport ne dépasse guère 3) (M. BOUNIAS, 1983, C.R. Soc. Biol., **177**, 14-21). Le grillon présente donc la caractéristique des orthoptères qui est d'utiliser très largement les lipides comme source d'énergie.

◊ Les triglycérides constituent, de loin, la forme dominante dans le tissu adipeux, mais également dans l'hémolymphe où ils précèdent les diglycérides 1-2. Les phospholipides libres constituent la plus importante fraction dans l'hémolymphe et la seconde dans le tissu adipeux.

◊ Les différences observées au niveau des glucides entre les Témoins du printemps et ceux de l'automne se retrouvent également, mais en sens opposé, chez les lipides (tableau 42).

Tableau 42 - Concentrations lipidiques mesurées chez le grillon à l'automne (Septembre-Octobre).

Composants	Hémolymphe $\bar{x}$	(N)	s_x	Tissu adipeux $\bar{x}$	(N)	s_x
PL	0,62	(3)	0,27	14,4	(3)	3,0
AG	0,03	(3)	0,002	1,16	(3)	0,38
DG 1-2	0,04	(3)	0,006	Traces		
DG 1-3	0,025	(3)	0,004	0,58	(3)	0,18
TG	0,07	(3)	0,008	7,98	(3)	1,27
St	0,30	(3)	0,05	10,6	(3)	1,3

On observe donc, entre les deux périodes de l'année, une inversion des proportions respectives des triglycérides et des stéroïdes tandis que les acides gras se maintiennent au même niveau.

◊ Corrélations intra-lipidiques - Dans l'hémolymphe, les phospho--lipides, les acides gras et les triglycérides suivent des variations de même sens, correspondant à un épuisement quasi total à partir du 3e jour. Dans le tissus adipeux, les PL, les AG, les DG 1-2, les DG 1-3 et les St présentent des variations de même sens avec deux mi-

nima à 3 jours et 7 jours, un pic à 5 jours et une remontée à 7 jours. Il est curieux de constater que dans l'hémolymphe, la somme des DG 1-2 et 1-3 varie de la même manière. Des variations de tendance opposée sont conjointement à noter pour les St de l'hémolymphe et les TG du tissus adipeux. Le tableau 43 présente les principaux paramètres statistiques correspondants.

Tableau 43 - Relations fonctionnelles intra lipidiques chez le grillon.

Composés en corrélations	ρ	(N)	t	P(ρ)	a	b	σ_b
DG 1-2(TA)/DG 1-3(TA)	0,948	5	5,16	0,014	-0,022	0,614	0,12
St(TA)/DG 1-2(TA)	0,948	5	5,16	0,014	0,95	3,30	0,64
St(TA)/AG(TA)	0,951	5	5,33	0,013	-0,081	0,639	0,12
DG 1-2(TA)/AG(TA)	0,897	5	3,51	0,039	0,363	0,901	0,256
DG 1-3(TA)/PL(TA)	0,896	5	3,50	0,038	8,79	9,10	2,60
St(TA)/PL(TA)	0,900	5	3,58	0,037	0,55	0,47	2,64
DG 1-2(TA)/TG(TA)	-0,634	5	1,42	0,25	1,58	-0,020	0,014
idem - pt. 7 j.	-0,894	4	3,45	0,041	2,13	-0,026	0,0075
DG (1-2)+(1-3)(Hml)/PL(TA)	0,966	5	6,47	0,007	6,60	166,05	25,77
TG(Hml)/PL(Hml)	0,972	5	7,16	0,005	0,283	1,720	0,24

◊ Corrélations glucido-lipidiques - Les glucides varient d'une manière rappelant celle des lipides du tissus adipeux (sauf TG) mais avec une remontée bien moins accentuée à 5 jours.

Les meilleures relations observées sont résumées dans le tableau 44.

Tableau 44

Composés en corrélations	ρ	(N)	t	P(ρ)	a	b	σ_b
Tre(TA)/AG(TA)	0,944	5	4,95	0,015	0,693	1,46	0,29
Tre(Hml)/AG(TA)	0,652	5	1,49	0,23	1,00	1,18	0,79
Glc(Hml)/AG(TA)	0,785	5	2,19	0,11	2,57	2,24	1,02

Les données numériques relatives à la rickettsiose sont en cours d'étude sous le même angle de vue.

◊ En conclusion, chez le grillon comme chez l'abeille, le jeûne entraîne un épuisement des métabolites qui, à partir d'un certain seuil, déclenche une réaction hyperglycémique et hyperlipémique. Les modalités de cette réponse, très vraisemblablement de type hormonal, seront analysées, au fil des mois à venir, par comparaison avec les réponses de la glycémie et de la lipémie de l'abeille, à des injections de facteurs hormonaux et anti-hormonaux.

IV - PROJETS DE RECHERCHES

A - Aucune étude de l'action de la toxine du Bti ne semble avoir jamais été envisagée chez l'abeille : elle pourrait être abordée par ingestion, (administrée dans un milieu nutritif) et même par injections. Les facteurs enzymatiques intervenant dans la libération de séquences toxiques pourraient être analysés in vitro. Il s'agit, en l'occurrence, d'une classe de pesticides au même titre que les autres, et qui devrait, de ce fait, figurer au "catalogue" des effets sémiologiques biochimiques. Ce travail pourrait faire l'objet d'une thèse.

B - Relations doses/effets et structure/activité des molécules de pesticides chez l'abeille, et leurs interactions avec les manifestations sémiologiques biochimiques d'agents parasites ou pathogènes.

Dans le cadre de ce projet, extrêmement vaste et à long terme, mais, nous semble-t-il, indispensable, un premier programme a été établi en vue d'associer l'étude de pyréthroïdes à celle de la varroose.

Cadre économique

Pour des centaines de milliers de familles françaises, l'Apiculture constitue soit la ressource principale, soit un revenu d'appoint indispensable dans des zones agricoles souvent défavorisées (en montagne, par exemple). D'autre part, la pratique agricole fait maintenant de plus en plus largement appel à la fonction pollinisatrice de l'Abeille, dont les effets se manifestent de manière très substantielle sur l'accroissement et l'homogénéité des productions fruitières, grainières

et légumières. Il s'agit là d'un facteur d'importance économique et sociale considérable, mais qui se trouve assujetti à des risques dont les conséquences sont actuellement dénoncées par les agriculteurs comme par les apiculteurs :

◊ d'une part, on constate des diminutions du cheptel dont les causes sont parfois connues ou prévisibles (invasion de l'Europe par le parasite Varroa, actuellement présent en France), mais, parfois incompréhensibles (enquêtes récentes).

◊ D'autre part, de nombreux pesticides présentent, vis-à-vis de l'Abeille, une toxicité directe à laquelle s'ajoute parfois un pouvoir répulsif également préjudiciable à la pollinisation, en particulier lors de traitements aux stades floraux.

Motivation des Recherches

Il apparaît comme très vraisemblable que des pesticides, même lorsqu'ils ne sont pas la cause directe de la mort des Abeilles, peuvent affecter leur résistance et provoquer un affaiblissement des colonies se traduisant, d'une part, par une moindre activité, et d'autre part, par une diminution de leur résistance aux facteurs parasites et pathogènes. Il s'agit là de facteurs toxicologiques "cryptiques" difficiles à mettre en évidence sur le terrain, comme en témoignent les affrontements juridiques actuels entre les professionnels apicoles et les fabricants de spécialités agrochimiques.

But des Recherches

Il serait très important de pouvoir conduire parallèlement les recherches sur deux fronts :

◊ d'une part, les mécanismes biochimiques de l'action des dérivés pyréthroïdes, (nouvelle génération de pesticides de synthèse d'une grande importance économique potentielle) sont encore pratiquement inconnus chez l'Insecte : or, ils doivent être impérativement analysés dans le double but d'améliorer -ou de préserver- l'efficacité de ces molécules chez les espèces nuisibles, tout en réduisant leur nocivité à l'égard des auxiliaires.

◊ D'autre part, la sémiologie biochimique des maladies de l'Abeille reste à établir, et mériterait d'être étudiée également sous l'angle des interactions éventuelles des molécules agrochimiques utilisées dans la pratique. Actuellement, l'extension de la Varroose constitue un problème de première importance, mais il est vraisemblable que d'autres maladies -de moindre importance par elles-mêmes- puissent se manifester avec davantage de gravité dans le contexte toxicologique lié aux pratiques agrophytopharmaceutiques actuelles.

PLAN DE RECHERCHE

A - Supports biochimiques

L'étude des glucides et lipides de l'hémolymphe et de l'ensemble intestin/corps adipeux, et celles des α-glucosidases de l'hémolymphe s'appuieront sur les données acquises au cours des dernières années sur la régulation du métabolisme glucido lipidique de l'Abeille, ainsi que sur les relations établies par corollaire entre le niveau de la glycémie et la productivité. Enfin, les phosphatases intestinales constituent un indicateur sémiologique important de l'action sublétale des pyréthroïdes*.

B - Développements expérimentaux

◊ 1ère phase - Les interactions glucido-lipidiques et enzymatiques feront l'objet d'une étude cinétique dans les heures qui suivent l'injection. Pour les doses les plus faibles, le suivi expérimental pourra être étalé sur 1 semaine environ, les Abeilles étant alors placées en cagettes spéciales et recevant leur nourriture naturelle (miel).

Les cinétiques seront reproduites avec plusieur concentrations d'insecticide, de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-1} x DL_{50} environ. (Durée prévue pour l'expérimentation et les calculs : 1 an).

◊ 2ème phase - Le même processus expérimental sera répété avec un second type de molécule choisi de manière à différer du précédent par 1 seul radical chimique (durée : 1 an).

◊ 3ème phase - La sémiologie biochimique de la maladie sera établie au cours d'une période de 1 à 2 semaines (maximum) à partir

* Publications de références : cf. liste jointe

d'Abeilles élevées artificiellement en cagettes. L'expérience sera reproduite après injection préalable de doses sublétales d'insecticide.

Les modifications des relations fonctionnelles seront alors comparées en fonction des 3 sources de traumatismes : toxicologique pure, pathologique pure, toxicologique + pathologique associées. (Durée : 1 an).

Le canevas de Recherche ainsi établi pourra servir de point de départ à l'extension du programme à d'autres molécules et à d'autres pathogènes en fonction des impératifs agricoles conjoncturels. Il pourra déboucher également sur une étude biochimique des conditions de prophylaxie de la maladie.

◊ **Aucune des demandes formulées à l'appui de ce programme n'a reçu de suite** : Le Ministère de la Recherche n'a pas répondu (ni accepté, ni refusé) à la demande de bourse, et les commissions de la CEE ont préféré privilégier d'autres projets en raison de leur moindre coût, bien que le comité d'examen "Varroa" se soit déclaré "vivement interessé par l'originalité et la nouveauté de celui-ci".

Troisième Partie

BIOCHIMIE PHYTOSEMIOLOGIQUE

I - MECANISMES BIOCHIMIQUES D'ACTION DE L'EPAL SUR LA RESISTANCE DU *Capsicum annuum* AU *Phytophthora capsici*. (R. LORIENT et M. BOUNIAS).

Ce chapitre représente une partie de la thèse de Doctorat de 3e cycle, soutenue le 7-12-84 par Mlle LORIENT (jury : MM. les Drs ROSSET, Président, ANDING, BOUNIAS, PRADET examinateurs, COULOMB, Directeur Universitaire de thèse).

Les composés de la famille du tris-o-éthyl-phosphate d'aluminium (E.P.A.L.) constituent une nouvelle classe de fongicides, découverte (par hasard) vers 1976. Bien que la "matière active" ne soit que peu ou pas du tout active sur les champignons, leur application sur les végétaux-hôtes leur confère, dans un certain nombre de cas, d'intéressantes propriétés de résistance.

Le mode d'action biochimique de ce composé étant encore très mal connu, son étude a été abordée au Laboratoire de Biochimie sous plusieurs angles, comparativement chez deux variétés de poivron sensible et résistante au mildiou.

- Modifications de l'équipement pigmentaire photosynthétique
- Modifications de la composition en glucides
- Modifications de la composition en acides aminés libres
- Recherches enzymologiques *in vivo* et *in vitro* au niveau des phosphatases foliaires.

NB : La variété sensible est "Yolo wonder"
La variété résistante est "Phyo 636"

A - Pigments photosynthétiques

Les tableaux 45 et 46 indiquent une série de résultats partiels relatifs aux teneurs des feuilles des variétés sensible et résistante saines ou contaminées, traitées ou non avec l'EPAl.

Tableau 45 - Résultats en l'absence de traitement ($\bar{x}$ et (s_x) en nmoles/mg de poids frais pour N=4).

Caractères :	sensible sains	résistant sain	sensible inoculé	résistant inoculé
Chlorophylles A	3,68(1,49)	3,55(0,78)	3,55(0,27)	3,29(0,48)
Chlorophylles B	1,26(0,06)	1,25(0,18)	1,53(0,10)	1,14(0,06)
Phéophytines*	2,08(0,59)	1,81(0,59)	2,80(0,28)	2,26(0,27)
β Carotène	0,52(0,36)	0,46(0,12)	0,66(0,11)	0,52(0,13)
Lutéine	1,53(0,57)	1,31(0,25)	1,87(0,44)	1,55(0,46)
Xanthophylles polaires	1,07(0,73)	0,74(0,15)	1,08(0,43)	0,91(0,44)

* Essentiellement A

Tableau 46 - Résultats après action de l'EPAl (cf. Tabl. 45)

	sensible sain	résistant sain	sensible inoculé	résistant inoculé
Chlorophylles A	4,59(0,12)	3,83(0,43)	3,51(0,20)	3,13(0,67)
Chlorophylles B	1,53(0,22)	1,18(0,11)	1,29(0,09)	1,25(0,18)
Phéophytines*	2,22(0,49)	1,48(0,31)	2,32(0,41)	2,37(0,50)
β Carotène	0,58(0,12)	0,42(0,07)	0,53(0,06)	0,58(0,07)
Lutéine	1,87(0,40)	1,23(0,10)	1,69(0,27)	1,73(0,32)
Xanthophylles polaires	0,95(0,12)	0,71(0,05)	0,96(0,30)	0,94(0,39)

Ces résultats appellent plusieurs remarques. En premier lieu, pour les pigments chlorophylliens et le β carotène (c'est-à-dire les dérivés les plus apolaires), l'inoculation entraine chez la variété sensible une hausse telle que les teneurs dépassent celles observées chez la variété résistante où l'inoculation agit, par contre, en sens inverse. D'autre part, l'EPAl confère également aux feuilles de la va-

riété sensible des teneurs supérieures à celles initialement présentes dans la variété résistante où le traitement provoque également un effet de sens opposé.

NB : Les données présentées ici sont encore provisoires.

B - Glucides

De nombreux composants ont été séparés et dosés. Seuls sont présentés ici (tableau 47) les résultats concernant ceux qui ont été identifiés.

Tableau 47 - Expression en nmoles/mg de poids frais ($\bar{x}$ et (s_x) pour N=4).

	saccharose	glucose	fructose
sensibles : sains	0,27(0,10)	1,75(0,51)	2,24(1,33)
résistants : sains	0,27(0,14)	2,52(0,70)	3,38(0,84)
sensibles : inoculés	0,24(0,10)	2,10(0,66)	0,76(0,23)
résistants : inoculés	0,40(0,15)	3,88(0,35)	4,35(0,62)
sensibles sains + EPA1	0,31(0,24)	2,49(0,53)	2,57(1,53)
résistants sains + EPA1	0,41(0,25)	3,56(1,02)	4,38(1,77)
sensibles inoculés + EPA1	0,56(0,02)	3,85(1,74)	4,72(1,38)
résistants inoculés + EPA1	0,72(0,38)	3,66(1,11)	4,46(2,47)

Les concentrations, initialement plus faibles dans la variété sensible, sont à peine accrues par l'inoculation, pour ce qui concerne le glucose et diminuées dans le cas du saccharose et du fructose : en revanche, toutes sont augmentées dans la variété résistante inoculée. Il est important de noter que l'EPA1 élève toutes les concentrations dans la variété sensible en les rapprochant ainsi de celles observées dans la variété résistante, fructose compris : cette observation pourrait annoncer un indice physiologique important, surtout si l'on se souvient du rôle régulateur important des dérivés phosphorylés 1-6 et 2-6 du fructose. (cf. C.R. Act. Lab. Biochimie 1974-1978).

C - Amino-acides libres

Une partie seulement des résultats a pu être dépouillée. Quelques données numériques relatives aux composants les plus abondants sont présentées dans les tableaux 48 et 49.

Tableau 48 - Résultats en l'absence de traitement (nmoles/mg de poids frais). Moyennes : $\bar{x}$ et écarts-types (s_x) pour N=4.

Caractères :	sensible sain	résistant sain	sensible inoculé	résistant inoculé
Lys	0,23(0,11)	0,75(0,39)	2,3 (0,42)	0,97(0,41)
Arg	0,40(0,03)	0,67(0,25)	1,58(0,31)	0,76(0,23)
His	0,39(0,13)	0,70(0,11)	1,5 (0,83)	1,19(0,36)
Ser	0,23(0,13)	0,48(0,17)	2,01(0,78)	0,49(0,21)
Asp + Asn	0,90(0,24)	1,27(0,30)	2,13(0,75)	0,98(0,33)
Glu + Gln	0,73(0,33)	1,32(0,16)	1,65(0,19)	1,74(0,49)

Tableau 49 - Résultats après action de l'EPA1

Caractères :	sensible sain	résistant sain	sensible inoculé	résistant inoculé
Lys	0,26(0,09)	0,56(0,23)	1,72(0,39)	0,65(0,23)
Arg	0,38(0,25)	0,43(0,15)	1,52(0,27)	0,40(0,15)
His	0,53(0,16)	0,41(0,18)	1,40(0,51)	1,04(0,49)
Ser	0,34(0,23)	0,37(0,07)	1,80(0,58)	1,18(0,21)
Asp + Asn	0,76(0,25)	0,92(0,44)	1,84(0,97)	1,34(0,50)
Glu + Gln	0,87(0,18)	1,65(0,69)	1,26(0,17)	1,53(0,16)

Ces recherches feront l'objet, au cours de 1985 (si tout va bien) d'une étude interprétative plus approfondie, sous l'angle des relations fonctionnelles normales et traumatiques entre les pigments, les glucides et les amino-acides libres, par comparaison avec les données établies antérieurement (cf BOUNIAS : thèse d'Etat, etc ...)

D - Phosphatases foliaires

Le choix des phosphatases est justifié par plusieurs arguments convergents : l'ion phosphoreux, qui pénètre dans la feuille grace aux radicaux éthyle, présente une analogie stérique avec le phosphate : il risque donc d'interférer avec les phosphatases en général et les ATPases en particulier. D'autre part, les phosphatases ont une valeur sémiologique très sensible pour tous les cas de traumatismes animaux et végétaux. Enfin, les phosphatases sont liées à l'élimination de dérivés phosphorylés tels que les oses-phosphates, dont le rôle métabolique régulateur est très important.

L'étude a été conduite sous plusieurs angles différents.

a) courbes $v=f(S)$: sensibles et résistants, sains et contaminés, traités ou non à l'EPAl in vivo
b) courbes $v=f(I)$: idem, à [S] cste
c) courbes $v=f(S) + I$: idem à [I] cste (I="phosphite")

Elle débouche sur la détermination, dans chaque cas, des trois paramètres fondamentaux : V_M, K, n_H dans les plants non traités, et des paramètres d'interaction K_i et n_i (pris dans le sens "activation" ou inhibition).

◊ Un premier point (inédit) concerne la constante thermodynamique de l'enzyme, calculée d'après l'équation d'Arrhénius :

$$\text{Ln } v = -\frac{E}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{Ln}A \qquad (R=8,31 \text{ J.d}^{-1} \text{ mole}^{-1})$$

Une série de mesures effectuées sur les deux variétés a donné les résultats suivants :
Var. sensible (Yolo) : de 23 à 30°C : E_A=13.337 J.mole^{-1}(N=3) S=2.557
Var. résistante (Phyo) : de 25 à 31°C : E_A=13.777 J.mole^{-1}(N=4) S=2.551

Les deux valeurs sont identiques à $P<0,01$.

◊ La part de la contribution des ATPases a été estimée par compétition de substrats : la vitesse de réaction en présence de 8 mM de

substrat chromogène artificiel a été mesurée également en présence de 16 mM d'ATP. La différence entre les deux valeurs indique une activité provenant de molécules d'enzyme sur lesquelles -au minimum- l'ATP n'est pas fixé (même s'il n'est pas nécessairement un substrat authentique au niveau des sites pour lesquels il marque une affinité).

Le tableau 50 indique une série de données numériques provisoires (le dépouillement n'étant pas complet sur ce point)/

Tableau 50 - Vitesses exprimées en $\mu M.mn^{-1}$ - Moyennes $\bar{x}$ et écarts-types S_x pour (N) mesures [$\bar{x}$ (N) s_x). S=8 mM - T° 28 ± 2°C - pH 7,4 ± 0,1.

	vitesse témoin	vitesse en présence d'ATP	vitesse résiduelle (enzyme fixant l'ATP)
Yolo sain	4,60(8)0,28	3,04(5)0,65	1,56 [33,9%]
Yolo inoc.	6,34(7)0,43	4,35(5)0,45	1,99 [31,3%]
Yolo sain + EPAl	6,83(10)0,79	4,56(5)1,09	2,27 [33,2%]
Yolo inoc. + EPAl	7,72(8)0,93	5,98(5)1,30	1,74 [22,5%]
Phyo sain	5,48(9)1,22	2,43(6)0,22	3,04 [55,5%]
Phyo inoc.	6,29(10)0,62	4,45(6)0,123	1,84 [29,2%]
Phyo sain + EPAl	5,66(9)0,88	3,16(5)0,79	2,50 [44,2%]
Phyo inoc. + EPAl	5,70(11)0,71	3,90(6)0,14	1,80 [31,7%)

L'augmentation de concentration en ATP observée chez la variété sensible (LORIENT et PRADET) après inoculation, peut s'expliquer ici dans le cas du traitement à l'EPAl, par une baisse préalable de l'activité ATPase limitant l'hydrolyse de l'ATP présent.

En revanche, chez Phyo (résistant), l'activité ATPase baisse après inoculation, (avec ou sans EPAl), de même que les teneurs en ATP : cette corrélation positive évoque plutôt, ici, une relation inductive négative consécutive à une baisse antérieure des teneurs en ATP.

Chez Yolo traité, les variations sont faibles : la fraction ATPase n'est pas modifiée. L'EPAl paraît donc capable d'agir sélectivement en abaissant l'activité ATPase dans les plants de la variété sensible contaminée : la "charge énergétique" donc le potentiel bioti-

que de la plante s'en trouverait, de ce fait, accrue.

Malheureusement, il n'a pas été possible d'établir, en l'état actuel, une étude concomitante des deux phénomènes à partir des mêmes extraits. Seules de nouvelles études cinétiques de leur évolution, à partir du début de l'inoculation, permettait d'établir la chronologie des événements, donc d'aboutir à une interprétation plus fondée.

◊ Les paramètres cinétiques ont été mesurés au cours de deux séries expérimentales successives. Des difficultés ont apparu du fait de l'hétérogénéité des cultures : le tableau 51 donne une série de résultats provisoires correspondant à l'une des séries.

Les calculs ont été effectués selon les méthodes algébriques de Endrenyi (1976) ou de Bounias (1979).

Tableau 51 - Paramètres cinétiques : V_M ($\mu M.mn^{-1}$) pour 1 mg poids frais par 100 µl de milieu réactionnel, K(mM) et n_H : $\bar{x}$ et (Sx) calculés pour N=5.

	V_M	K	n
Yolo sain	8,7(1,3)	4,45(0,79)	0,83(0,07)
Yolo inoc.	8,4(1,2)	2,13(0,45)	1,03(0,14)
Phyo sain	16,0(1,6)	5,63(0,67)	0,74(0,03)
Phyo inoc.(*)	8,6(1,1)	3,21(0,56)	0,87(0,06)
Yolo sain + EPA1	13,6(0,93)	3,67(0,36)	0,68(0,03)
Yolo inoc. + EPA1	14,3(0,92)	3,88(0,32)	0,64(0,02)
Phyo sain + EPA1(*)	6,8(0,22)	3,01(0,13)	0,94(0,04)
Phyo inoc. + EPA1(**)	7,2(0,65)	1,69(0,24)	1,52(0,24)

(*) données à recalculer après correction des valeurs (mesurées à température trop basse) d'après les données thermodynamiques
(**) Valeurs provenant de données encore incomplètes.

Les mêmes mesures ont été répétées en présence de 16 mM de phosphite de sodium : elles ont donné les paramètres résultants suivants.

Tableau 52 - Paramètres résultants.

	V_{MR}	K_R	n_R
Yolo sain	6,95(1,64)	6,03(1,59)	0,83(0,07)
Yolo inoc.	7,23(0,54)	3,76(0,36)	1,03(0,07)
Phyo sain	9,53(1,45)	4,61(1,06)	0,70(0,06)
Phyo inoc.(*)	17,32(2,37)	7,38(1,14)	0,59(0,02)
Yolo sain + EPAl(*)	17,25(2,62)	10,06(1,68)	0,65(0,02)
Yolo inoc. + EPAl	10,75(1,25)	3,75(0,54)	0,80(0,05)
Phyo sain + EPAl(*)	9,28(0,66)	7,81(0,63)	0,77(0,02)
Phyo inoc. + EPAl(*)	10,67(2,00)	6,24(1,36)	0,93(0,08)

(*) Valeurs établies d'après des données incomplètes.

◊ Les résultats précédents montrent de grandes variations en fonction des variétés et des conditions expérimentales : sans préjuger de ce que donneront les moyennes des résultats complets, l'une des causes de variations après action de l'EPAl sur les feuilles a pu être identifiée : il s'agit du mode d'action du radical phosphite sur l'activité enzymatique, qui présente l'allure générale des phénomènes de régulation de type "allostérique". (Fig. 42).

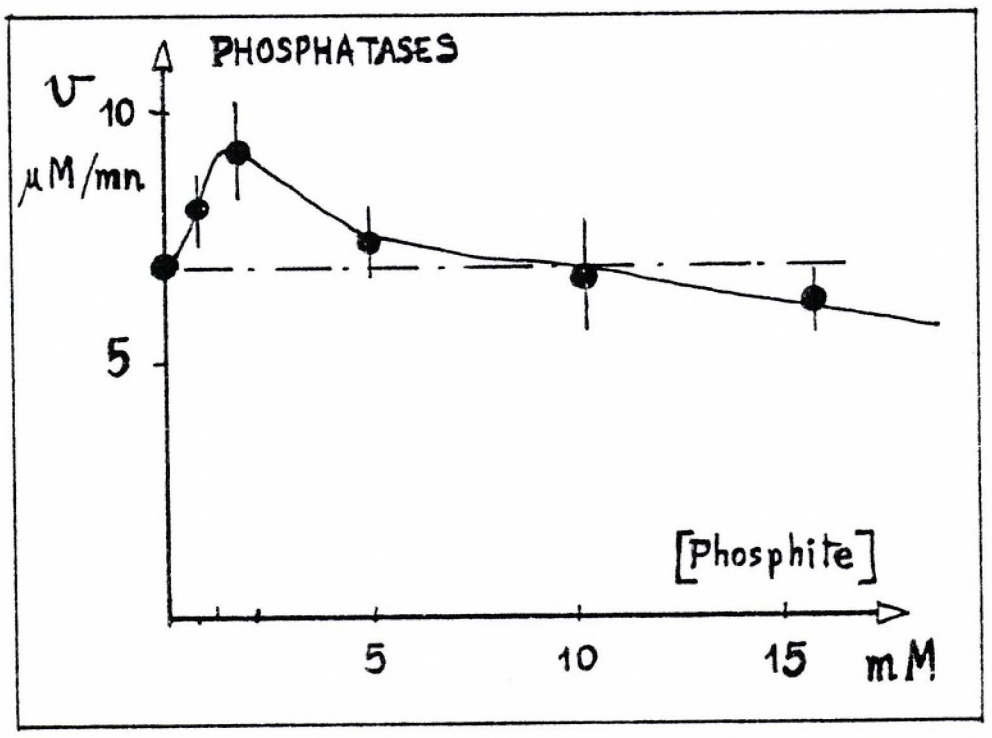


Fig. 42 - Variations de l'activité des phosphatases foliaires de Capsicum annuum en fonction des concentrations en phosphite in vitro

Il apparaît à l'évidence que, selon les quantités de phosphite ayant pénétré dans les tissus foliaires, les paramètres d'activité des phosphatases peuvent être largement modifiés, voire contradictoires (en apparence).

Ces résultats sont en cours d'approfondissement.

◊ Il est néanmoins permis de conclure, dores et déjà, que la structure du radical phosphite intervient directement dans les mécanismes moléculaires par lesquels d'EPAl confère au poivron une résistance accrue au Mildiou.

II - MECANISMES MOLECULAIRES ASSOCIES A L'INDUCTION DE RESISTANCE DU POIVRON AU MILDIOU. (Mme C. COULOMB et M. BOUNIAS).

Ce chapitre résume les résultats relatifs à la poursuite des analyses déjà abordées depuis 1983-1984. Les phénomènes sont toujours étudiés au travers de leur incidence sur l'équipement photosynthétique, en mettant à profit les améliorations techniques apportées en cours d'année. Les deux variétés : sensible (yolo) et résistante (phyo) ont été comparées à l'état sain et inoculé. Dans ce cas, l'incidence de l'inoculation a été étudiée également au niveau de la feuille suivante (notée : 2e feuille), afin d'examiner les possibilités de transfert de signaux physio-pathologiques. Enfin, l'action de l'éliciteur "G_1" a été examinée chez les deux variétés.

Les enregistrements photométriques ont été réalisés sur CS920. Les données numériques ont été exprimées en unités provisoires (nmoles/mg de poids frais) converties par simple relation linéaire : les valeurs définitives tiendront compte des coefficients d'expansion linéaire de chaque composant.

A - Action comparée de l'inoculation sur les variétés sensible et résistante.

Les fig. 42 et 43 présentent respectivement un chromatogramme "standard" ainsi que d'autres types de chromatogrammes destinés à mettre en évidence les deux phéophytines (A et B) et, éventuellement, la présence de dérivés oxydés du carotène (dont la mobilité est comprise entre celle du β carotène et celle de la phéophytine A).

Quelques résultats numériques sont présentés dans le tableau 53.

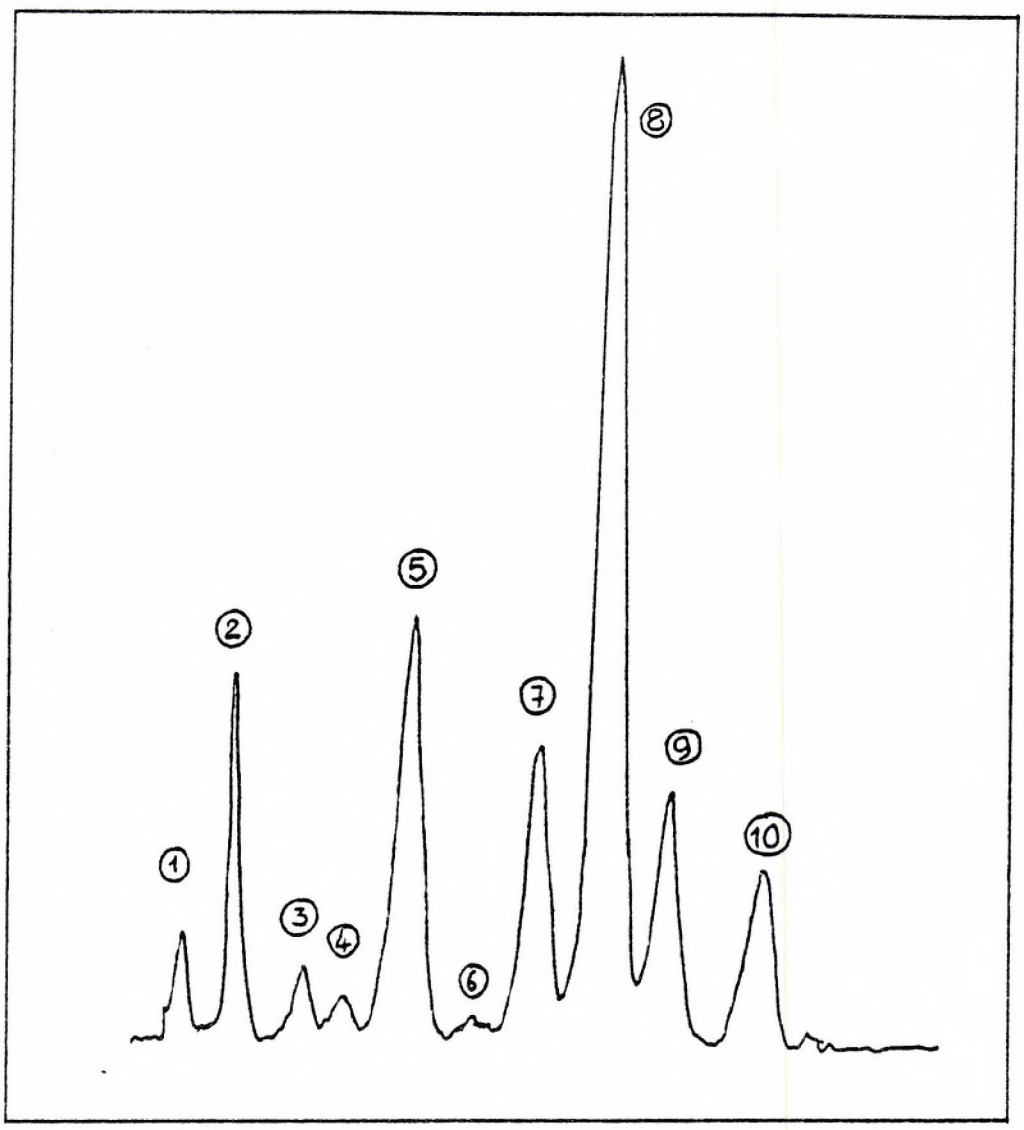


Fig. 43 - Chromatogramme des pigments photosynthétiques de 1 mg de feuilles de "Yolo", avec l'éluant : Heptane-acétate d'éthyle (40-60 v/v).
① = chlorophyllides/phéophorbides ; ② = néoxanthine ; ③ et ④ = violaxanthines (Ox et red) ; ⑤ = lutéine ; ⑥ = Chl.A' ; ⑦ = Chl. B ; ⑧ = Chl. A ; ⑨ = phéophytines ; ⑩ = β carotène.

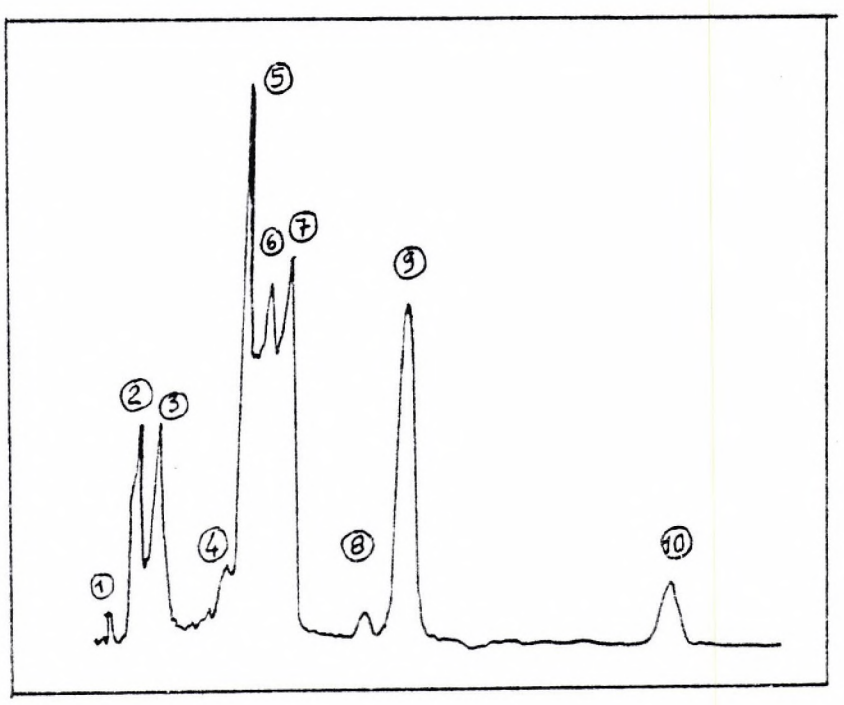


Fig. 44 - Chromatogramme des pigments photosynthétiques de 1 mg de feuilles de "Yolo" avec l'éluant : cyclohexane-acétone (80-20 v/v).
① = chlorophyllides/phéophorbides ; ② = néoxanthine + violaxanthines ; ③ = lutéine ; ④ = Chl. B' ; ⑤ = Chl. B ; ⑥ = Chl. A' ; ⑦ = Chl. A ; ⑧ = phéo. B ; ⑨ = Phéo A; ⑩ = β carotène.

Tableau 53 - Pigments photosynthétiques dans les feuilles de Capsicum annuum : variétés sensible (Yolo) et résistante (Phyo), saines ou après inoculation du Mildiou. Expression en nmoles par mg de poids frais. Les moyennes $\bar{x}$ et les écarts-types s_x sont calculés pour (N) mesures.

Pigments	yolo sain $\bar{x}$ (N) s_x	phyo sain $\bar{x}$ (N) s_x	yolo inoc.	phyo inoc.
β carotène	0,16 (3)0,06	0,12 (3)0,04	0,20 (3)0,06	0,21 (3)0,06
Phéo A	0,66 (3)0,23	0,75 (3)0,15	0,98 (3)0,27	1,01 (3)0,43
Phéo. B	0,02 (2)0,01	0,016(2)	0,114(2)0,02	0,165(1)
Chl. A	1,19 (4)0,54	1,01 (4)0,31	1,60 (4)0,37	1,51 (4)0,36
Chl. B	0,39 (4)0,035	0,37 (4)0,02	0,54 (4)0,12	0,50 (4)0,15
Chl. A'	0,04 (2)0,03	0,01 ...	0,19 (2)0,07	0,08 (3)0,04
Lutéine	0,626(2)0,03	0,55 (2)0,02	0,89 (2)0,07	0,89 (2)0,03
Vx (1) (réd.)	0,12 (2)0,02	0,10 (2)0,01	0,15 (2)0,06	0,17 (2)0,030
Vx (2) (ox.)	0,09 (2)0,06	0,04 (2)0,01	0,095(2)0,04	0,18 (2)0,06
Néoxanth.	0,36 (2)0,03	0,32 (2)0,01	0,41 (2)0,02	0,41 (2)0,04
Chldes et Ph.des	0,07 (2)0,02	0,07 (2)0,01	0,21 (2)0,03	0,15 (2)0,05

L'état de contamination augmente les concentrations de tous les pigments, et fait apparaître en quantités appréciables une phéophytine supplémentaire (B ou A') et un dérivé oxydé de la chlorophylle A.

La remarque inverse s'applique, à l'état sain, au passage de la variété sensible à la variété résistante : tout se passe comme si le caractère de résistance "anticipait" ainsi sur l'état d'infection, par une variation de sens opposé seuls les phéophorbides, très polaires, et la phéophytine A échappent à cette variation.

B - Action de l'éliciteur "G 1"

Une préparation obtenue à partir d'un filtrat de culture du champignon a pour propriété d'induire (en anglais "elicit") une résistance de l'hôte, lorsqu'elle est mise au contact de celui-ci.

Cette induction s'accompagne-t-elle de manifestations biochimiques, et de quelle manière, comparativement, dans la variété sensible et dans celle déjà douée de propriétés de résistance ? Telles sont les questions

auxquelles les recherches en cours visent à apporter des éléments de réponse.

Le tableau 54 indique une série de données numériques partielles.

Tableau 54 - Action de l'"éliciteur" G1 sur la composition en pigments photosynthétiques des variétés du poivron sensible (Y) et résistante (Ph) au Mildiou. [$\bar{x}$ en nmoles/mg et s_x pour (N) mesures].

	variété sensible		variété résistante	
	Yolo témoin	Yolo + G1	Phyo témoin	Phyo + G1
β carotène	0,27 (4)0,04	0,27(4)0,04	0,26(4)0,04	0,27 (4)0,04
Phéo. A	0,60 (4)0,31	0,62(4)0,22	0,58(4)0,23	0,58 (4)0,27
Phéo. B	0,065(4)0,06	0,04(4)0,01	0,05(4)0,05	0,075(4)0,07
Clo. A	1,58 (2)0,50	1,49(2)0,23	1,41(2)0,10	1,55 (2)0,29
Chl. B	0,48 (3)0,10	0,46(3)0,12	0,43(3)0,12	0,48 (3)0,10
Lutéine	0,83 (2)0,11	0,70(2)0,07	0,69(2)0,14	0,84 (2)0,02

Ces résultats confirment la baisse déjà observée des pigments, (ici : chlorophylles et lutéine) dans la variété résistante, par rapport à la variété sensible : l'éliciteur agit sur la variété sensible en rapprochant ses paramètres biochimiques de ceux de la variété résistante ; en revanche, dans la variété résistante, l'éliciteur rétablit les valeurs caractéristiques de la souche sensible non traitée : ce qui évoque la "pression de l'homéostasie" vers le retour aux caractères de la souche sensible, génétiquement moins "fragile" ...

C - Caractérisation de l'induction acquise par inoculation d'une virose.

Le virus (P 1-2) est inoculé à une feuille désignée comme "1ère feuille" : les analyses sont effectuées sur cette même feuille ainsi que sur la suivante, dans l'ontogenèse, notée "2e feuille", comparativement aux feuilles de même âge de plants sains.

5 séries d'analyses ont été effectuées pour chacune des deux variétés. Des longueurs d'ondes différentes ayant été utilisées lors des enregistrements, les données numériques ont été converties en quantités molaires d'après des coefficients provisoires susceptibles de cor-

rections (courant 85) pour aboutir aux données définitives.

Les résultats obtenus pour l'instant sont présentés dans les tableaux 55 et 56.

Tableau 55 - Influence de la virose sur les concentrations des pigments photosynthétiques de la variété sensible. [$\bar{x}$ (nmoles/mg), (N), S_x].

	Témoins	Virosés	
		feuilles inoc.	2e feuilles
β carotène	0,234(5)0,027	0,212(5)0,023	0,236(5)0,045
Phéo. A	0,684(5)0,187	0,533(5)0,069	0,594(5)0,128
Phéo. B	0,72 (2)0,16	0,035(2)0,007	0,070(2)0,040
Chl. A	1,73 (5)0,095	1,19 (5)0,115	1,63 (5)0,251
Chl. B	0,355(5)0,071	0,284(5)0,026	0,430(5)0,044
Lutéine	1,24 (5)0,25	1,36 (5)0,30	1,23 (5)0,15
Vx-1 (réd.)*	0,18 (2)0,03	0,31 (2)0,05	0,13 (2)0,08
Vx-2 (Ox.)*	0,35 (2)0,18	0,26 (2)0,02	0,40 (2)0,33
Néoxanth.	0,67 (3)0,13	0,55 (3)0,09	0,73 (3)0,12
TOTAL	6,16	4,734	5,45

(*) Vx-1 et Vx-2 semblent correspondre aux formes mono 5-6 et di-époxyde de la lutéine (violaxanthine réduite et normale).

Tableau 56 - Influence de la virose sur les concentrations des pigments photosynthétiques de la variété résistante. [$\bar{x}$ (nmoles/mg), (N), S_x].

	Témoins	Virosés	
		feuilles inoc.	2e feuilles
β Carotène	0,235(5)0,051	0,234(5)0,053	0,305(5)0,047
Phéo. A	0,686(5)0,090	0,814(5)0,167	0,804(5)0,205
Phéo. B	0,059(2)0,035	0,069(2)0,004	0,077(2)0,056
Chl. A	1,64 (5)0,24	1,55 (5)0,25	1,74 (5)0,29
Chl. B	0,56 (5)0,085	0,64 (5)0,079	0,71 (5)0,10
Lutéine	0,44 (5)0,07	0,55 (5)0,08	0,57 (5)0,04
Vx-1*	0,11 (3)0,03	0,24 (3)0,08	0,11 (2)0,04
Vx-2*	0,12 (3)0,03	0,27 (3)0,14	0,36 (3)0,28
Nx	0,72 (3)0,18	0,79 (3)0,19	0,92 (3)0,26
TOTAL	4,57	5,157	5,596

(*) Vx-1 et Vx-2 semblent correspondre aux formes mono 5-6 et di-époxyde de la lutéine (violaxanthine réduite et normale).

Une première série de conclusions peut être tirée de ces données numériques : la virose diminue les concentrations pigmentaires globales dans les feuilles inoculées de la variété sensible alors qu'elle les augmente dans la variété résistante. Les feuilles suivantes subissent des variations de même sens, mais d'amplitude atténuée dans la variété sensible et accrue dans la variété résistante.

Ces variations ne concernent pas tous les pigments : dans la variété sensible, la lutéine et son époxyde varient en sens opposé, et le β carotène varie peu, tandis que dans la variété résistante, le β carotène et la chlorophylle A ne sont que très peu affectés. L'interprétation physiologique de ces données sera développée au cours de 1985.

III - ETUDE DES GLUCIDES DANS LE LIBER DE Pinus sylvestris EN RELATION AVEC LES PHENOMENES DE RESISTANCE. (Mme B. FREROT et M. BOUNIAS, avec la participation technique de Mme DAURADE).

Les scolytes provoquent dans certains secteurs, en voie d'extention, d'importants dégâts dans les forêts de résineux, auxquels s'ajoutent les traumatismes dus aux variations de teneurs hydriques des sols. L'appréciation des potentialités de résistance et de "vigueur biotique" des arbres constitue un objectif important auquel le laboratoire a apporté, en 1984, sa participation dans le cadre d'une "ATP" intitulée "Physiologie des résineux", à laquelle participent la station de zoologie et biocoenotique forestières d'Orléans et la direction régionale de l'O.N.F. .

1 - Matériel et méthodes - Les analyses ont été effectuées sur des arbres provenant du clone "Haguenau" (Nogent-sur-Vernisson : parc des BARRES ; Nancy : parc du CNRF). Les recherches ont porté d'une part sur la comparaison des tiges et d'autre part, pour chaque tige, sur la comparaison de la composition du liber respectivement à 1 m et 3 m de hauteur (en relation avec les niveaux d'attaque possibles des parasites).

Le liber est détaché en plaques de ≃1,5 x 0,3 cm. Des prélèvements de 100 à 150 mg sont prélevés et broyés au Potter en présence d'un solvant d'extraction. La présence de substances hétérosidiques associées à des terpénoïdes et des tannins provoque, sur les chromatogrammes, l'ap-

parition de "traînées" préjudiciables aux analyses. Le premier objectif a donc été de tenter d'y remédier. Deux voies ont été explorées : les solvants d'extractions et les traitements préalablement apportés aux plaques.

◊ Les solvants d'extractions

Le but est d'essayer de séparer les glucides libres des composés interférant avec la chromatographie, principalement sous forme de "traînées" brunes après révélation des plaques (fig. 45).

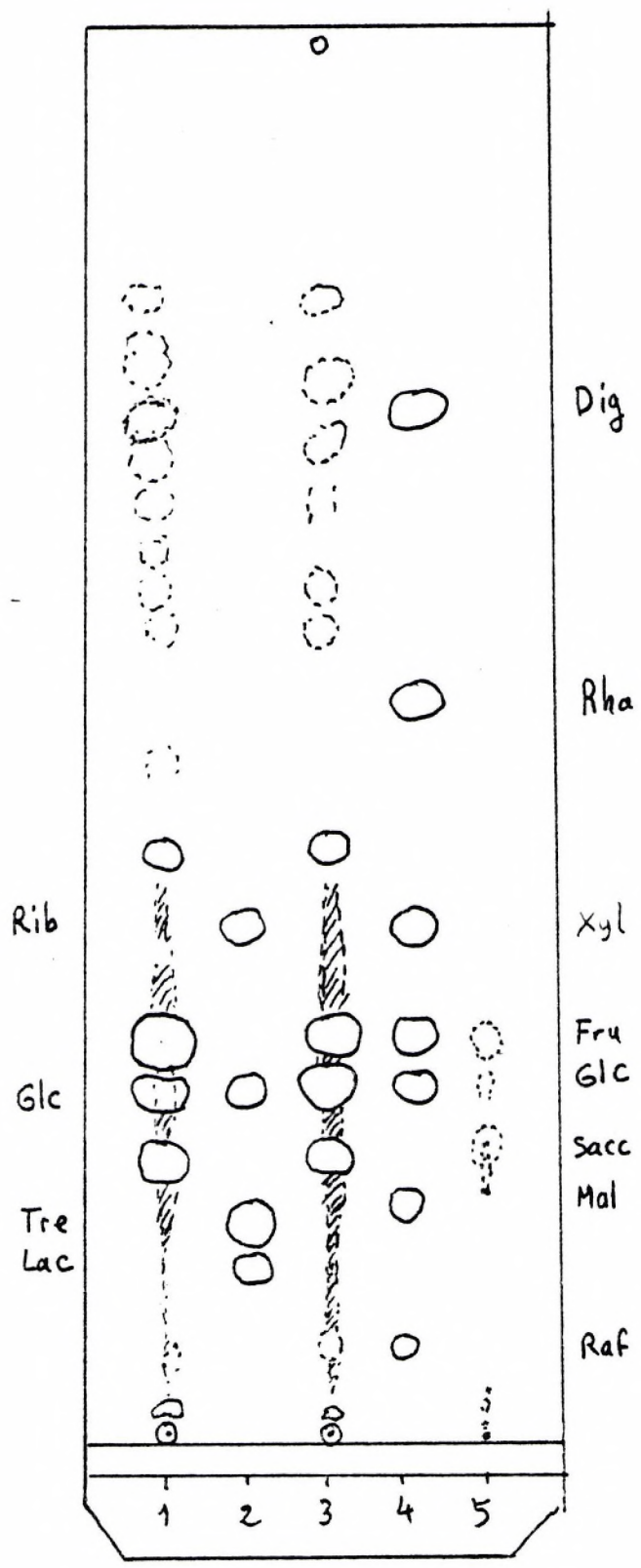


Fig. 45 - Difficultés dans la chromatographie des glucides du liber de Pins sylvestres.
extrait direct : n°3
extrait chloroformique préalable :
n°5 = phase $CHCl_3$
extrait post chloroformique :
n°1 (voir texte)

L'éluant ethanol-eau-pyridine (4-5-1 v/v) extrait un nombre élevé de composants glucidiques, y compris dans les zones correspondant aux constituants de faible polarité (point n°3 fig. 45) mais une traînée rend le dosage imprécis. Un essai d'élimination préalable de lipides par le chloroforme suivi d'une extraction des glucides comme précédemment n'améliore guère les résultats : la phase aqueuse contient toujours des produits "parasites" (pt n°1 fig. 45) lesquels ne se retrouvent pas dans la phase chloroformique (pt n°5) qui, en revanche, entraîne un peu de fructose une trace de glucose, et du saccharose en proportions variables.

Les composés parasites étant manifestement de structures polaires, d'autre solvants plus "nuancés" ont été essayés. Leur liste est donnée dans le tableau 57.

Tableau 57 - Solvants utilisés pour les recherches sur l'extraction sélective des glucides du Pin sylvestre (CCM/Silice pH 6,8).

N°	Solvants (proportions v/v)	Plaques
1	Méthanol-chloroforme-HCl concn. (50-50-0,1)	84-46 et 47
2	Méthanol-$CHCl_3$-eau-HCl (50-40-10-1)	84-59/61
3	Méthanol-$CHCl_3$-eau-HCl (50-30-20-1)	84-60
4	Méthanol-acétate d'éthyle-HCl concn. (50-50-0,1)	84-47/48/56
5	Méthanol-acét. d'éthyle-HCL concn. (10-90-0,1)	84-49
6	Acétate d'éthyle-HCl (10-0,01)	84-50
7	Pyridine-eau (40-60)	84-61
8	Eau distillée (100)	84-61

Les éluants n°5 et 6 extraient peu ou pas du tout les glucides (un peu de saccharose et de fructose avec le n°5), mais pas davantage les tannins. Le solvant n°1 est, en revanche, plus sélectif pour la classe des glucides, (à concurrence avec le mélange éthanol-eau-pyridine) alors que le n°4 extrait une forte quantité de substance parasite. En dernier ressort, le mélange pyridine-eau (n°7) et l'eau pure donnent (sensiblement à égalité) les meilleurs résultats pour les formes les plus polaires tandis que le n°2 favorise l'extraction des fractions les moins polaires (mobilité supérieure ou égale à celle du rhamnose). Quelques données numériques (exprimées en unités provisoi-

res) sont indiquées dans le tableau 58 et illustrées par la fig. 46.

Tableau 58 - Extraction comparée des glucides du liber.

	solvant n°2	solvant n°7	solvant n°8
Raffinose	88	123	46
Saccharose	623	589	539
Glucose	64	62	49
Fructose	127	270	259

Le solvant d'extraction à retenir est donc le mélange pyridine--eau, dans des proportions à réexaminer autour de 40-60 (soit 20-80 ; 30-70 ; 50-50 p. ex.).

◊ Le traitement des plaques.

Les divers traitements appliqués à la préparation des plaques sont résumés dans le tableau 59.

Tableau 59 - Analyse des glucides du liber du Pin sylvestre : étude de l'action du traitement des plaques.

N°	Imprégnant	pH	n° plaques
1	pas d'imprégnant	acide	84-52
2	$K H_2 PO_4$ (0,4 M)	4,6	84-57
3	$KH_2 PO_4 + Na_2 HPO_4$ (0,4 M)	6,8	84-45
4	$Na_2 HPO_4$ (0,4 M)	9,2	84-51

Le pH neutre donne une bonne proportion entre mobilité et résolution mais les plaques se conservent mal : le fond se colore et se couvre de taches violacées.

Les pH acides donnent une grande mobilité mais ne résolvent pas le mélange (glc + fru). Les plaques se conservent bien, avec un fond clair peu taché.

Le pH basique entraîne une faible mobilité, mais une bonne résolution du mélange (glc + fruc). En outre, la conservation est excellente, avec un fond intact. Enfin, les traînées "parasites" sont moins perceptibles aux pH neutre et basique, qu'aux pH acides.

On pourra donc retenir l'imprégnation à pH 9,2, qui aboutit, au contact des fonctions acides faibles de la silice, à créer un effet tampon à pH final in situ voisin de 8.

2 - Résultats

Les premières séries d'analyses ont porté sur 5 pieds différents provenant du même clône, désigné par H8 (âge : 20 ans). Le tableau 60 indique une première série de résultats provenant de l'intégration automatique sur CS930. Les quantités déposées, en équivalents de poids frais, s'étendent de 0,125 mg à 0,72 mg.

Tableau 60 - Résultats provisoires d'analyse des glucides du liber de 5 brins du clône H8, à des hauteurs de 1 m et 3 m. Les moyennes, $\bar{x}$, sont exprimées en nmoles/mg et les écarts-types (S_x) sont donnés pour N=2 mesures.

Brins n°		1	2	3	4	5
Glucides	haut.					
Raf.	1 m	1,62(0,05)	1,66(1,02)	3,18(0,41)	2,57(1,74)	30,5(29,3)
	3 m	2,16(0,60)	1,97(0,04)	3,49(0,42)	1,90(0,87)	13,2(12,2)
Sacch.	1 m	506,7 (104,7)	390,0 (31,6)	811,0 (99,9)	191,9 (10,6)	237,5(31,9)
	3 m	661,9 (89,9)	633,3 (171,5)	1032 (10,7)	263,0 (35,2)	135,2(3,7)
Glc	1 m	111,2 (20,9)	56,7 (11,0)	126,7 (18,2)	60,9 (51,7)	79,5(63,9)
	3 m	95,4 (8,7)	73,7 (0,4)	131,7 (6,7)	56,8 (44,9)	35,1(24,5)
Fru	1 m	30,4 (3,3)	27,4 (11,6)	41,9 (6,0)	72,5 (18,4)	112,5(11,5)
	3 m	34,8 (9,6)	34,3 (7,1)	41,5 (10,9)	100,5 (40,3)	73,13(22,9)
Xyl*	1 m	0,43(0,08)	1,36 -	3,83(1,01)	0,71(0,11)	1,09(0,17)
	3 m	1,47(1,24)	1,76(1,17)	3,50(0,17)	1,23(0,53)	0,37(0,09)
Rha*	1 m	0,30(0,29)	0,11 -	0,40 -	0,47(0,02)	0,22 -
	3 m	0,52 -	0,02 -	0,67 -	0,28 -	0,56(0,45)
Dig*	1 m	1,23(0,92)	1,12(0,87)	6,21(0,115)	0,23(0,135)	0,68(0,66)
	3 m	2,48(0,14)	0,30(0,004)	3,43(2,57)	1,58(0,52)	0,49 -

(*) Composés de mobilité comparable à celle des étalons indiqués.

Ces résultats permettent d'établir les corrélations existant, pour chaque glucide, entre les teneurs à 1 m et celles à 3 m. Les résultats sont résumés dans le tableau 61 et illustrés par les figures 46 à 48.

Tableau 61 - Paramètres statistiques relatifs aux corrélations 1m/3m (calculs provisoires sur N/2).

Glucides	Brins n°	ρ	P(ρ)	a	b	σ_b
Raf.	1-2-3	+ 0,990	0,090	- 0,54	1,06	0,15
	1-2-3-4	+ 0,75	0,25	0,47	0,75	0,46
	1-2-3-4-5	+ 0,990	0,001	- 3,82	2,58	0,212
Sacch.	1-2-3	+ 0,98	0,127	-172	0,96	0,19
	1-2-3-4	+ 0,98	0,02	-49,3	0,81	0,116
	1-2-3-4-5	+ 0,95	0,013	64,4	0,67	0,127
Glc	1-2-3	0,90	0,287	-14,9	1,13	0,547
	1-2-3-4	0,92	0,08	- 1,0	1,01	0,30
	1-2-3-4-5	0,78	0,119	36,1	0,65	0,30
Fru	1-2-3	0,99	0,09	-35,7	1,87	0,266
	1-2-3-4	0,98	0,02	9,73	0,63	0,090
	1-2-3-4-5	0,73	0,16	3,62	0,90	0,486
Xyl*	1-2-3	0,99	0,09	- 1,69	1,58	0,225
	1-2-3-4	0,98	0,02	- 1,36	1,48	0,212
	1-2-3-4-5	0,86	0,061	- 0,20	1,01	0,346
Rha*	1-2-3	0,99	0,09	0,10	0,43	0,061
	1-2-3-4	0,61	0,39	0,20	0,33	0,303
	1-2-3-4-5	0,45	0,447	0,20	0,24	0,27
Dig*	1-2-3	0,75	0,46	0,04	1,36	1,19
	1-2-3-4	0,73	0,27	- 0,71	1,49	0,98
	1-2-3-4-5	0,75	0,144	- 0,40	1,38	0,70

(*) Composés de mobilité comparable à celle des étalons indiqués.

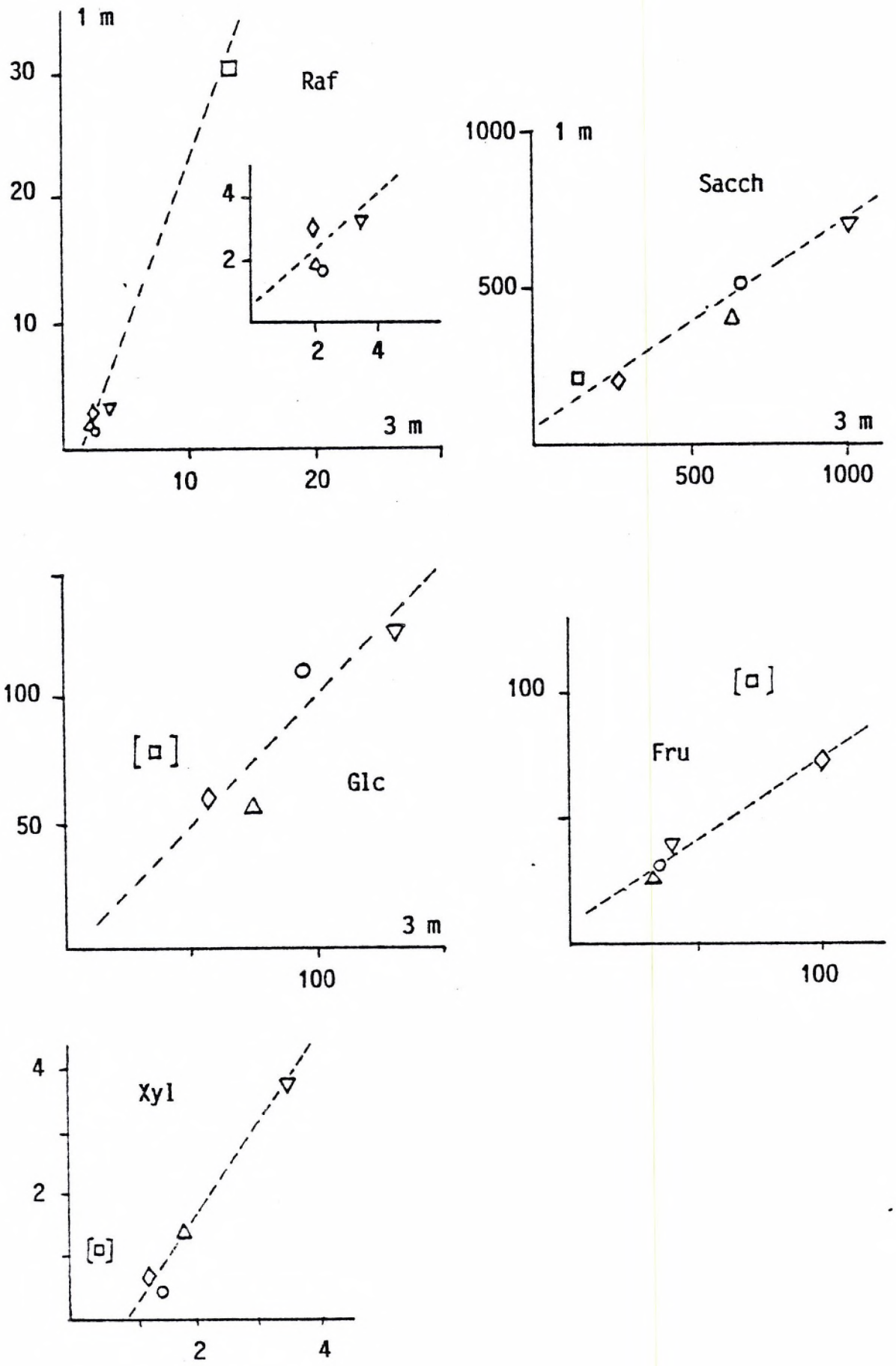


Fig. 46 - Corrélations entre les concentrations glucidiques (nmoles/mg) du liber de Pin sylvestre prélevé à 1 m (ordonnées) et 3 m (abscisses) sur 5 pieds différents : (o)=1 ; (Δ)=2 ; (∇)=3 ; (◊)=4 ; (□)=5.

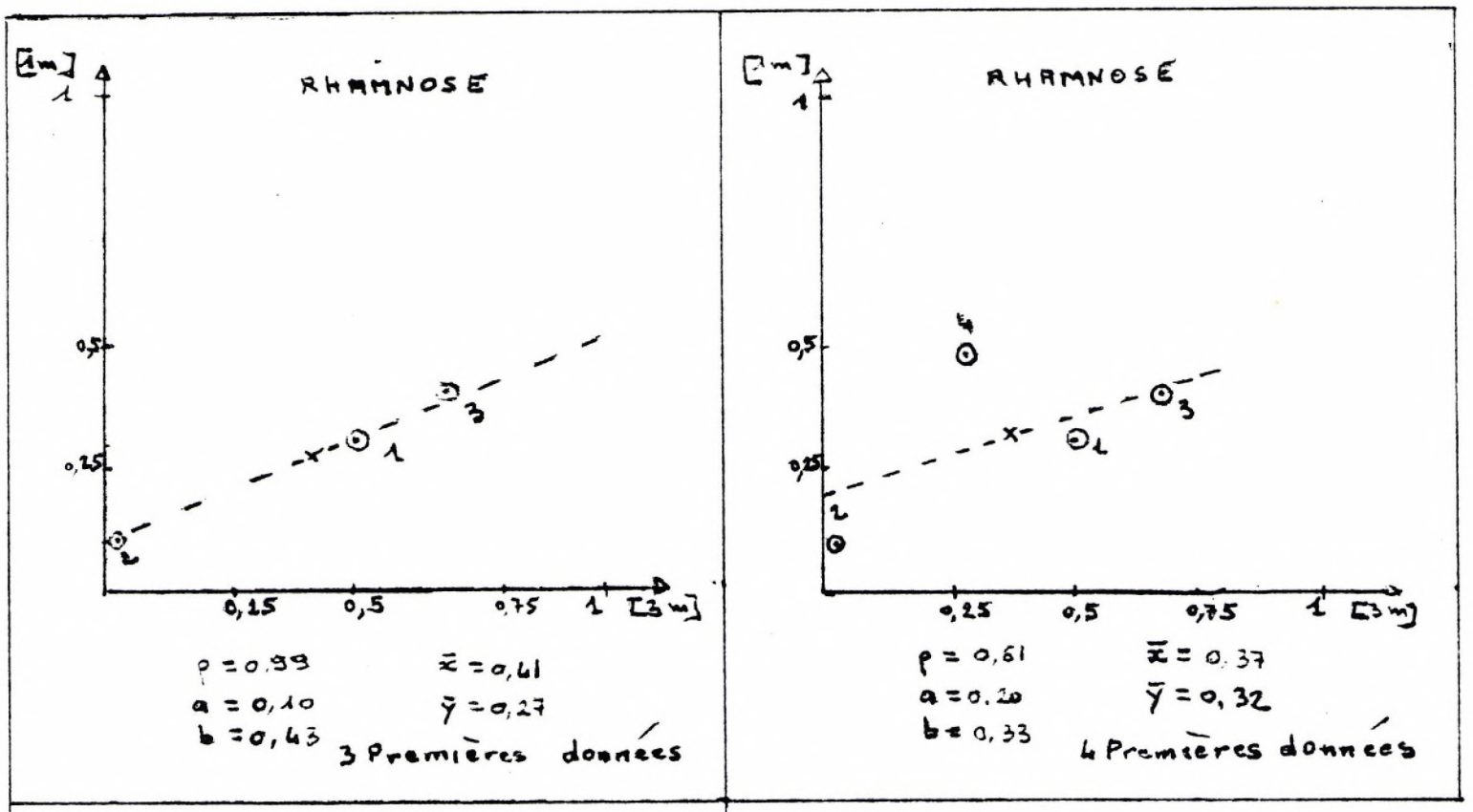


Fig. 47 - Analyse des corrélations entre concentrations du rhamnose du liber de Pins sylvestre prélevé à 1 m et à 3 m.

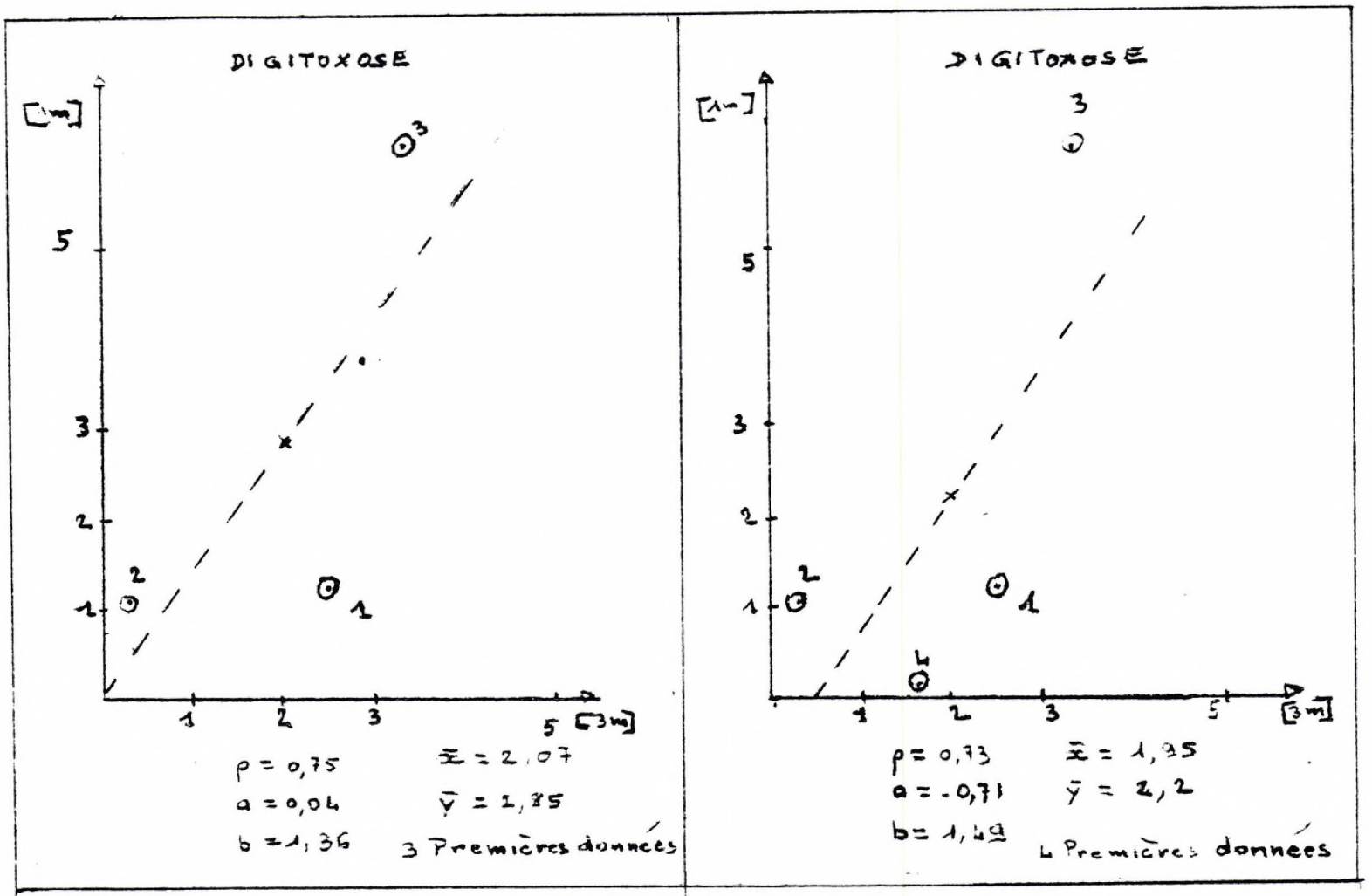


Fig. 48 - Analyse des corrélations entre concentrations du digitoxose du liber de Pins sylvestre prélevé à 1m et 3m.

Il apparaît ainsi de bonnes corrélations entre les teneurs glucidiques respectives à 1m et 3m, entre les brins n°1 à 4, tandis que le brin n°5 s'écarte de la relation. En outre, ces corrélations sont plus faibles avec les 2 composants de moindre polarité.

Les moyennes générales calculées pour chaque brin, à partir des valeurs mesurées à 1m et 3m, (dont le cumul est rendu légitime par les résultats du tableau 61) permettent d'ébaucher, ensuite, une première analyse des relations fonctionnelles intra-glucidiques. Le tableau 62 résume les paramètres statistiques obtenus pour l'instant.

Tableau 62 - Recherche des relations fonctionnelles intra-glucidiques à partir de 5 pieds de Pins sylvestre provenant du clône "Haguenau". (Calculs provisoires sur N/2).

Composants associés	N°	ρ	P(ρ)	a	b	σ_b
Raf/Sacch	1 à 4	0,68	0,32	1,39	0,0017	0,0012
	1 à 5	-0,52	0,37	13,65	-0,015	0,014
Raf/Glc	1 à 4	0,70	0,30	1,00	0,015	0,0108
	1 à 5	-0,40	0,50	15,3	-0,11	0,14
Raf/Fru	1 à 4	0,10	>0,5	2,20	0,003	0,021
	1 à 5	0,67	0,21	-4,71	0,19	0,12
Raf/Xyl	1 à 4	0,95	0,05	1,47	0,50	0,116
	1 à 5	-0,30	>0,5	9,4	-2,11	3,87
Raf/Rha	1 à 4	0,41	0,50	1,83	2,21	3,47
	1 à 5	0,43	0,5	-1,35	30,92	37,48
Raf/Dig	1 à 4	0,92	0,08	1,62	0,34	0,102
	1 à 5	-0,34	>0,5	9,16	-1,67	2,66
Glc/Fru	1 à 4	-0,47	0,53	117,8	-0,60	
	1 à 5	-0,61	0,27	119,7	-0,65	0,48
Glc/Xyl	1 à 4	0,78	0,23	55,7	19,6	11,1
	1 à 5	0,81	0,096	50,6	21,3	8,90
Glc/Rha	1-3-4-5	-0,93	0,07	419	-1112	310,7
	1 à 5	0,11	>0,5	75,5	29,9	1199,3
Glc/Dig	1 à 4	0,93	0,07	55,5	16,2	4,52
	1 à 5	0,94	0,015	53,4	16,8	3,52
Fru/Xyl	1 à 4	-0,20	>0,5	57,8	-4,0	13,8
	1 à 5	-0,38	0,528	71,1	-9,4	13,2

Tableau 62 (suite)

Fru/Rha	1 à 4	0,54	0,46	23,7	109,0	120
	1 à 5	0,64	0,25	18,3	157,6	109,2
Fru/Dig	1 à 4	-0,24	>0,5	54,7	-33,1	94,6
	1 à 5	-0,43	0,50	69,7	-7,3	8,85
Sacch/Glc	1 à 4	0,92	0,08	-143,7	7,90	2,38
	1 à 5	0,93	0,014	-231,4	8,67	1,97
Sacch/Fru	1 à 4	-0,65	0,35	-7,1	902	745,6
	1 à 5	-0,78	0,119	-7,7	922	427,0
Sacch/ (Glc+Fru)	1 à 4	0,43	>0,5	19,8	3,9	5,79
	1 à 5	0,23	>0,5	139,7	2,5	6,11
Sacch/Xyl	1 à 4	0,85	0,15	245,5	185,0	81,0
	1 à 5	0,86	0,061	168,2	210,5	72,1
Sacch/Rha	1 à 4	-0,01	>0,9	-	-	-
	1-3-4-5	-0,92	0,08	369	-10737	3234,3
	1 à 5	-0,26	>0,5	640,8	-623,8	1337,5
Sacch/Dig	1 à 4	0,89	0,11	284	133,4	48,3
	1 à 5	0,90	0,037	149,4	224,3	62,7
Xyl/Rha	1-2-4-5	-0,89	0,11	1,27	-1,27	0,46
	1 à 5	-0,01	0,99	-	-	
Xyl/Dig	1-2-4-5	0,13	>0,7	-	-	-
	1 à 5	0,95	0,01	0,38	0,65	0,12
Rha/Dig	1-3-4-5	-0,84	0,16	0,32	-0,01	-
	1 à 5	0,10	0,74	-	-	-

Il apparaît alors que la distinction entre le brin n°5 et les 4 autres ne se maintient pas au niveau des relations fonctionnelles, sauf, semble-t-il, dans les relations comportant le raffinose (fig. 49).

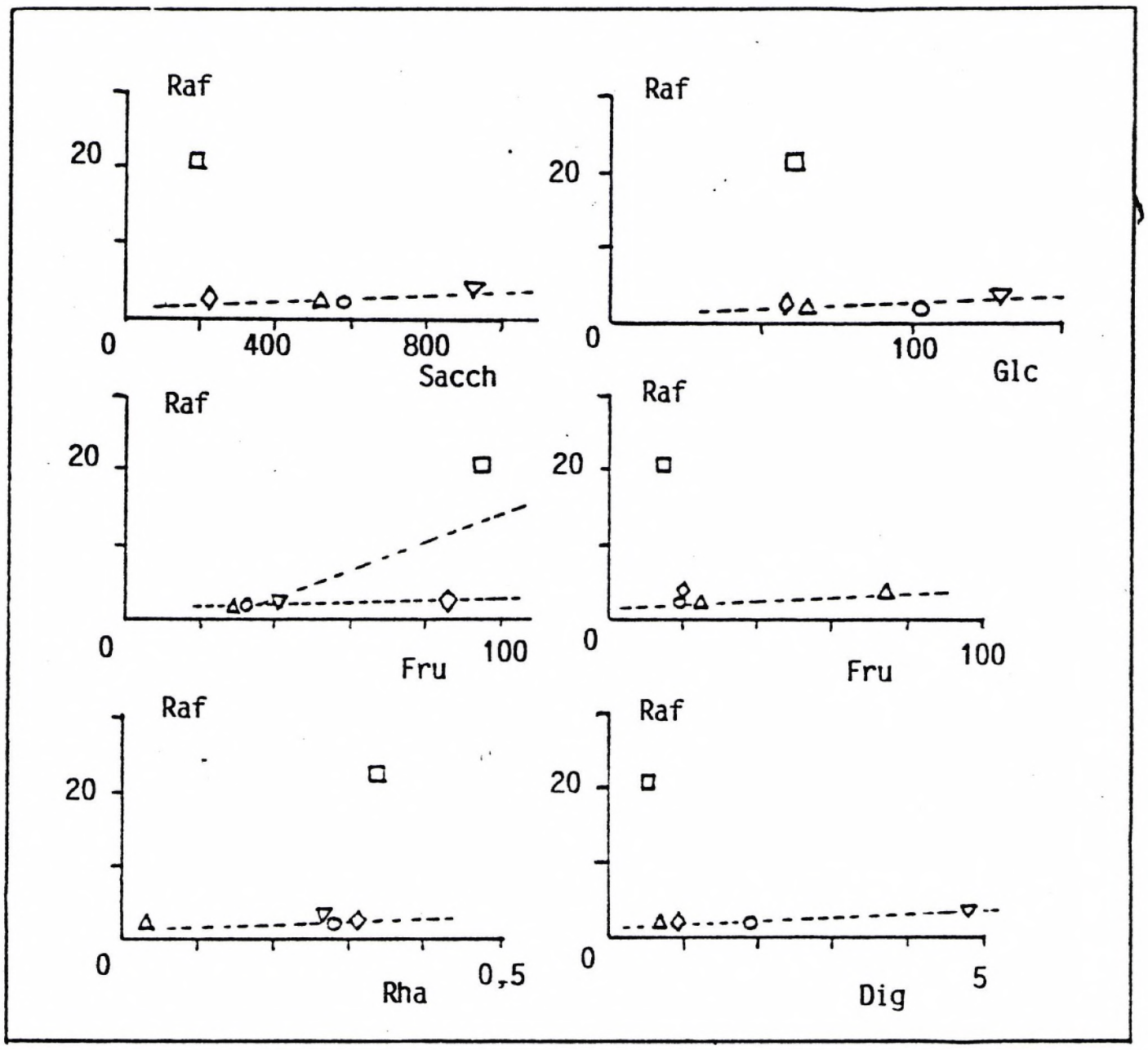


Fig. 49 - Relations entre le raffinose et les autres glucides dans les tiges de Pins sylvestre n°1 (o) ; 2 (Δ) ; 3 (∇) ; 4(◊) ; 5 (□).

Les plus significatives, parmi les autre relations sont illustrées par les fig. 50 et 51.

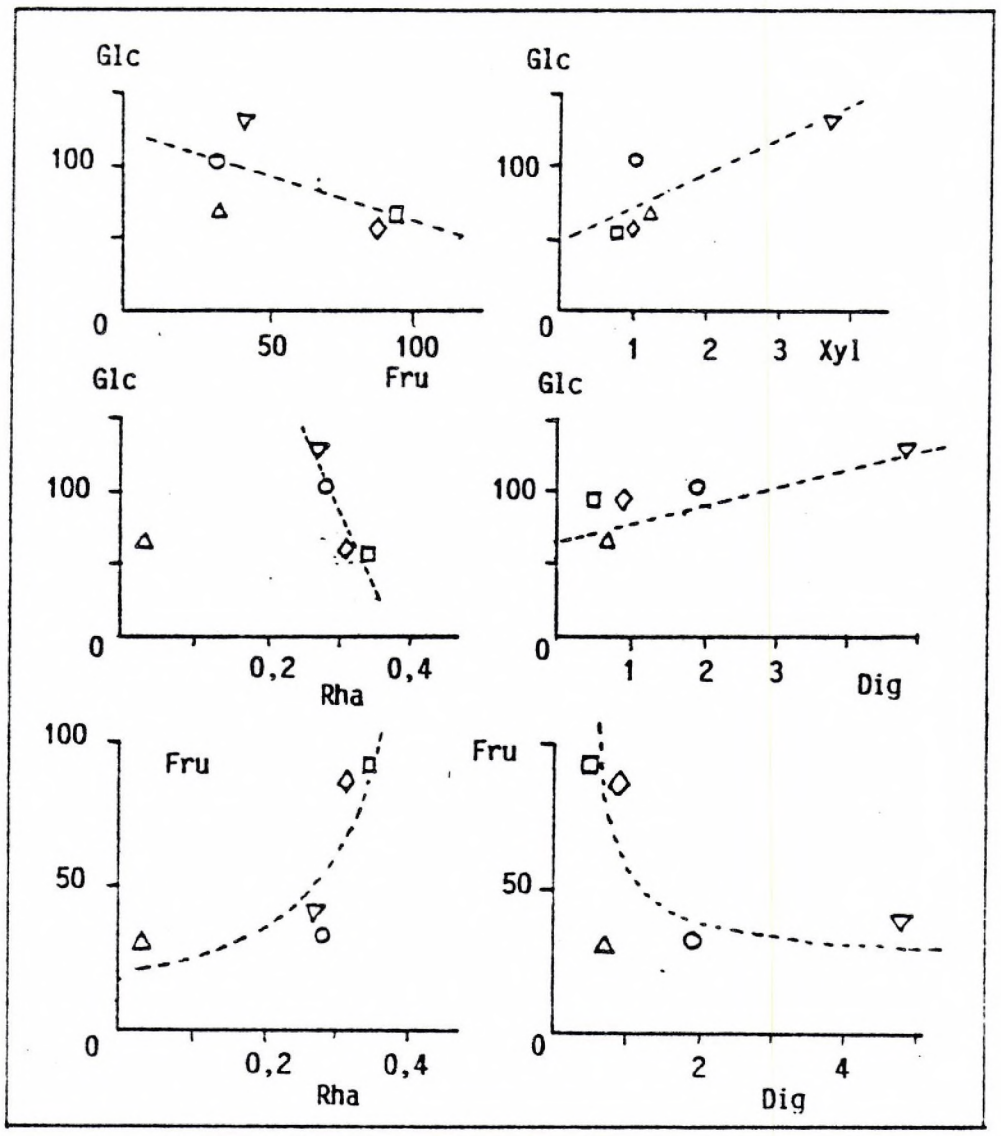


Fig. 50 - Relations fonctionnelles impliquant le glucose et le fructose (symboles comme sur la fig. 48).

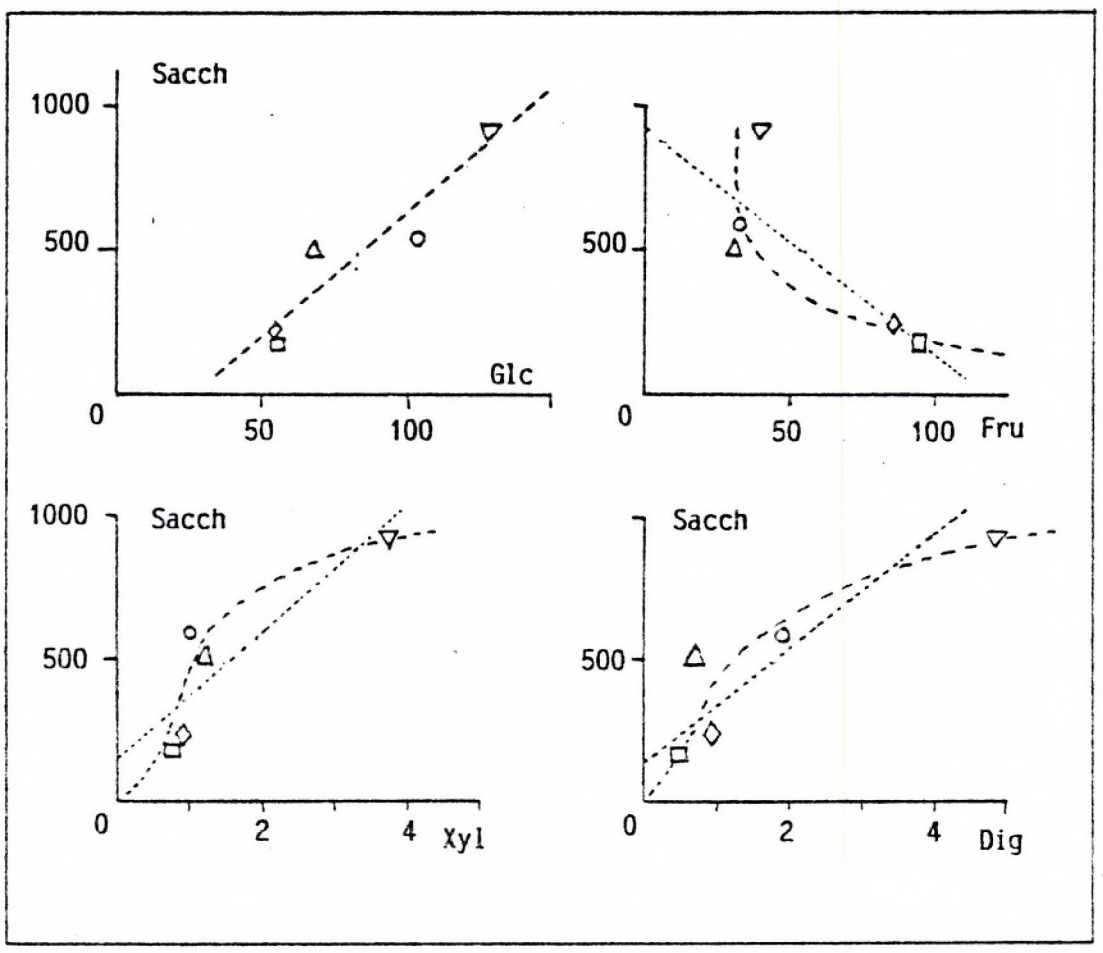


Fig. 51 - Relations fonctionnelles impliquant le saccharose. (symboles comme sur la fig. 48)

Le glucose et le fructose sont en corrélation négative, d'où il ressort que leurs relations respectives avec le saccharose sont de sens opposé. Le composant analogue au digitoxose est positivement corrélé au glucose et au saccharose, négativement au fructose. Le rhamnose subit des variations de sens opposé.

L'ensemble des relations s'interprète selon le schéma de la fig. 52.

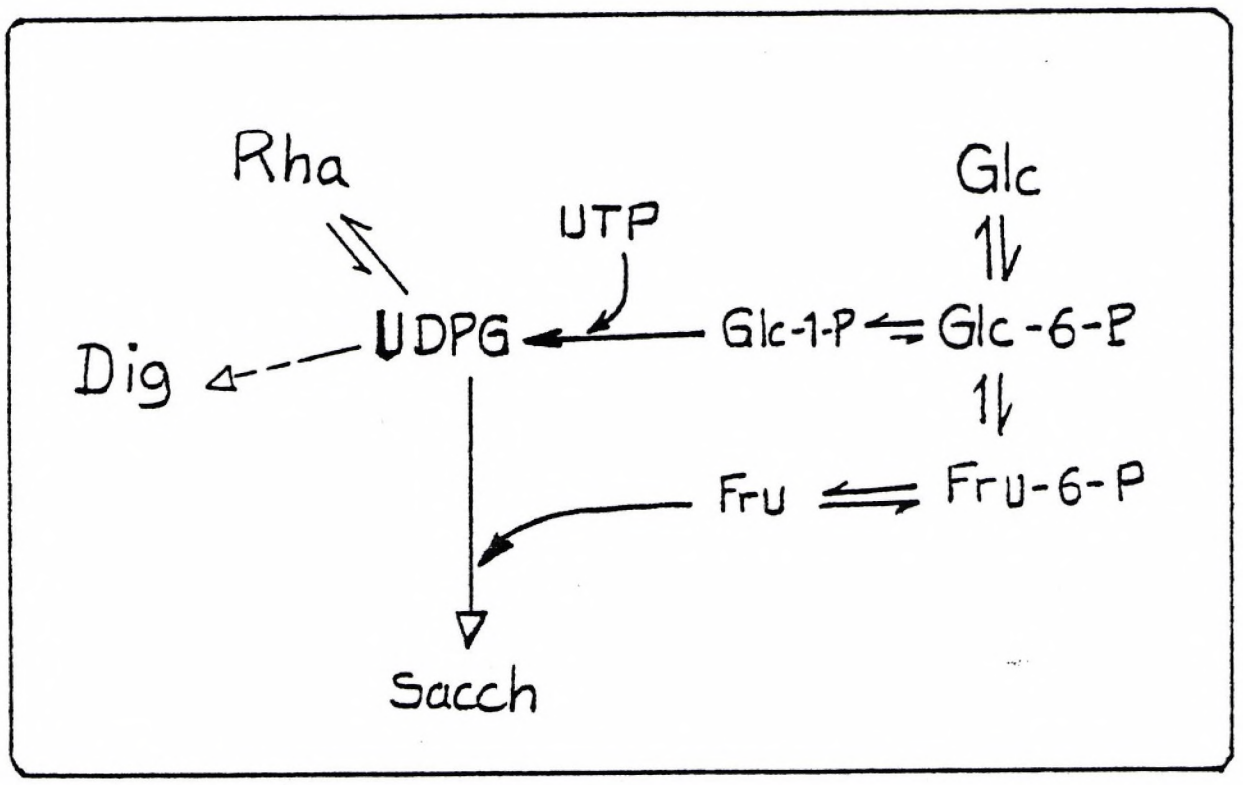


Fig. 52 - Voies du métabolisme glucidique (cf. BOUNIAS et COULOMB, 1983 Can. J. Bot., **62**, 1036-1043).

IV - IMPLICATION DE MOLECULES PHENOLIQUES DANS LES PHENOMENES DE RESISTANCE CHEZ LES VEGETAUX. (M. BOUNIAS, C. et Ph.J. COULOMB, LEVIEUX et al.)

Ce chapitre regroupe sous un même titre, deux projets abordés respectivement en collaboration avec l'Université d'Avignon (laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales : Prof. COULOMB) et avec l'Université d'Orléans (station de zoologie et biocoenotique forestières : Prof. LEVIEUX, et O.N.F.) (Projet A.T.P.).

La lignification constitue l'une des voies de défense des Végétaux, en réponse à diverses catégories de traumatismes. Or, les voies de biosynthèse des lignines passent par la formation de dérivés mono

ou polyphénoliques, tels que les acides sinapique, caféique, férulique, coumarique, etc ..., qui sont polymérisés après activation par oxydation en présence de FAD et formation de radicaux libres sur les monomères. Le $FADH_2$ est ensuite régénéré par autoxydation avec formation de H_2O_2 et induction d'une activité péroxydasique.

En outre, les dérivés phénoliques peuvent être liés à des glucides pour constituer des hétérosides susceptibles d'intervenir également dans les mécanismes de résistance.

Techniques - L'analyse de ces divers composés (aglycones et glycosides) est abordée conjointement par CCM et par HPLC. Si des différences de composition apparaissent en relation avec les phénomènes de résistance, les molécules impliquées seront isolées et purifiées par HPLC et analysées par CCM après hydrolyse chimique et/ou enzymatique.

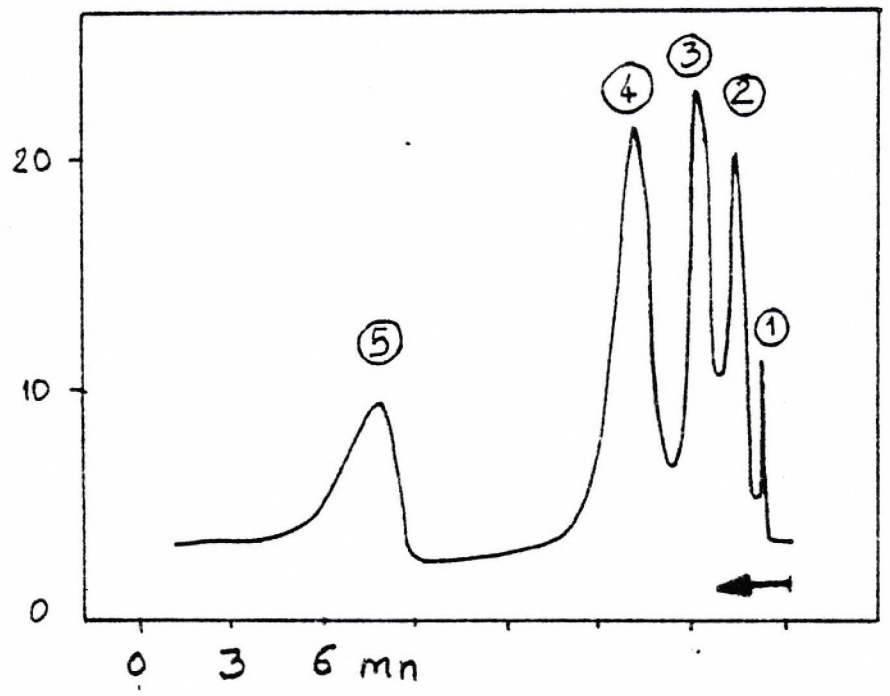


Fig. 53 - Séparation par HPLC d'un mélange de substances phénoliques :
① injection
② ac. caféique
③ ac. férulique
④ ac. cinnamique
⑤ rutine
Longueur d'onde de détection : $\lambda = 254$nm

Analyse préliminaires : le mélange méthanol-eau-ac. acétique (57-40-03, 67-30-03 et 70-27-03, v/v) sépare rapidement les composants d'un mélange comprenant : ac. cinnamique, ac. férulique, ac. caféique et rutine, par HPLC sous $2,7.10^3$ psi et un débit de 1,5 ml/mn, en colonne bondapack C18 de 15 cm. (Fig. 52). Les temps de rétention paraissent augmenter, en première analyse, avec le nombre d'hydroxyles phénoliques des molécules (fig. 54).

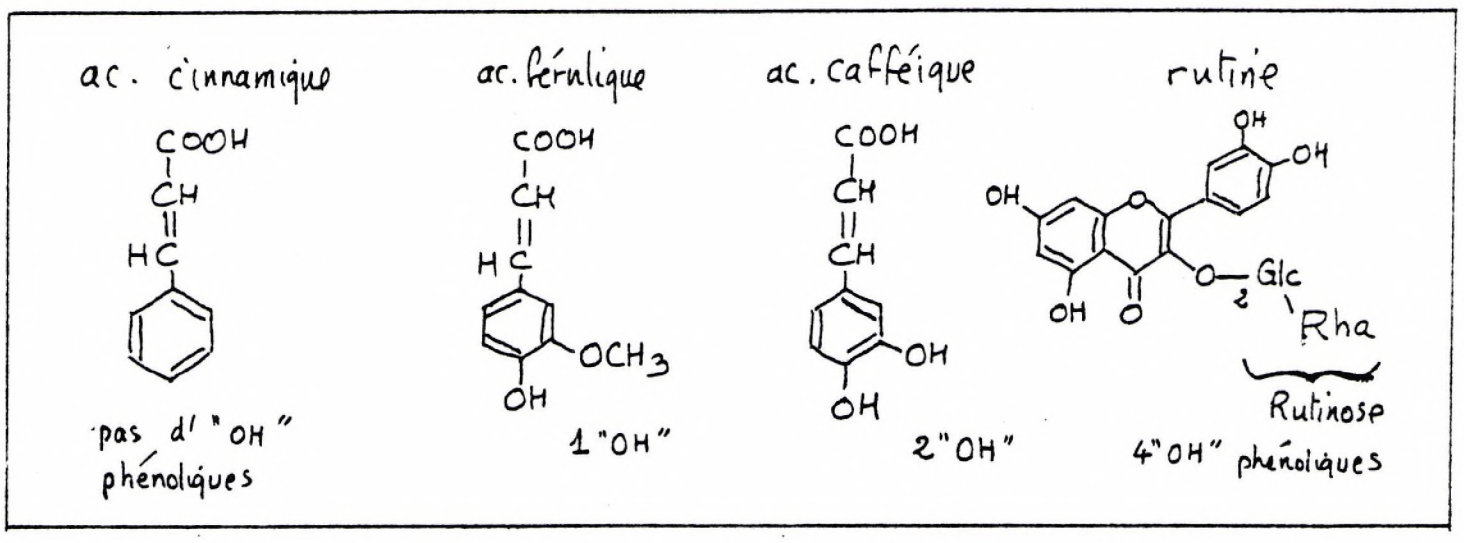


Fig. 54 - Structures à relier aux propriétés chromatographiques.

Résultats - Des extraits alcooliques de feuilles de Capsicum annuum saines ou contaminées par le Mildiou ont été traités par HPLC selon le système du "step gradient" (gradient discontinu). Les premiers chromatogrammes, illustrés par la figure 55, ont montré certaines différences entre les deux extraits. (Première expérimentations : 19 et 20 Avril 1984).

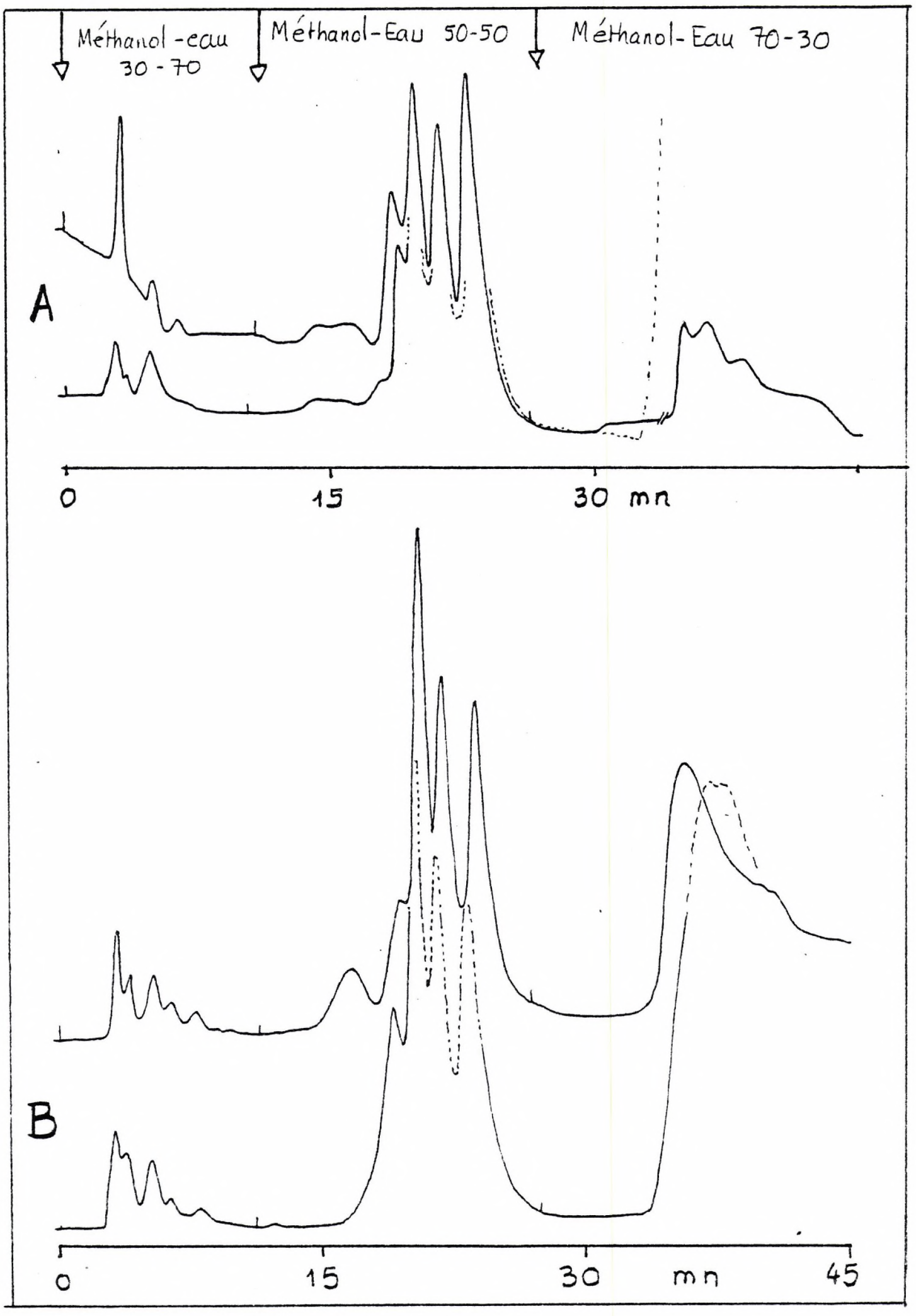


Fig. 55 - Action de la contamination sur la composition en dérivés phénoliques des feuilles de Capsicum : A=Témoins ; B=inoculés.

Des divergences qualitatives apparaissent au niveau de la fraction éluée avec 30% de méthanol et quantitatives dans la fraction éluée avec 50% de méthanol. Une séparation plus fine devrait être obtenue avec des concentrations successives de 20%-40%-60% : les recherches devraient être poursuivies sur cette base en 1985. L'un des principaux facteurs limitants est le manque de surface de laboratoire pour l'accueil de chercheurs extérieurs.

V - RECHERCHES SUR LES GLUCIDES DES FEUILLES DE PECHER EN RELATION AVEC LA RESISTANCE AUX ATTAQUES PAR LES PUCERONS. (M. BOUNIAS et M. MASSONIÉ*)

(*) INRA-BORDEAUX - Dépt. de Zoologie

Le puceron s'établit, au début, sur les jeunes feuilles des arbres sensibles, où se déroulent la ponte et le début du nourrissement. La première génération se développe en une dizaine de jours. La colonie se développe, ensuite, sur des feuilles devenues plus âgées (feuilles "moyennes") pendant 2 à 3 générations. Lorsque les feuilles sont devenues "âgées", la colonie de pucerons les abandonne au profit de jeunes feuilles.

L'hypothèse d'un déterminisme biochimique est étayée par la mise en évidence de différences de composition "phénolique" entre feuilles résistantes et sensibles, MACHEIX ayant montré que chez les arbres résistants, les feuilles étaient globalement moins riches en phénols, mais contenaient des dérivés plus toxiques pour les pucerons. Il s'agirait de composés différents des anthocyanes.

L'appétence pourrait, par ailleurs, dépendre de la composition glucidique (le saccharose serait, par exemple, plus favorable que les hexoses).

Des échantillons de diverses feuilles de variétés sensibles et résistantes ont été prélevés à Bordeaux en vue d'une analyse comparée des glucides libres.

Malheureusement, des pannes de secteur ont privé d'électricité le laboratoire où des échantillons étaient conservés congelés, et les prélèvements ont été réchauffés et rendus inutilisables.

D'autres échantillons ont été prélevés, mais à une date inévitablement tardive et moins favorable à l'expression de la sensibilité : les analyses ont été néanmoins effectuées à la demande de la station de zoologie, à titre préliminaire, afin de permettre de juger de l'opportunité d'engager, dans cette étude, les moyens nécessaires demandés par le laboratoire de Biochimie.

Matériel et méthodes - Des feuilles jeunes apicales (notées "P"), moyennes (notées "M"), et basale, âgées (notées "G") ont été prélevées sur trois variétés

- Porte-greffe GF305 : sensible
- Variété S2678 : résistant
- Porte-greffe S2811 : intermédiaire (3 semaines de phase résistante)

Le croisement du 2678 avec la variété Redhaven donne deux génomes, l'un résistant, R , l'autre sensible, S , comme indiqué sur la feuille descriptive (tableau 63 joint en annexe), accompagnant les prélèvements.

Les séries analytiques 84-36 et 84-37 concernent les jeunes feuilles ("P"). Les séries analytiques 84-38 et 84-39 concernent les feuilles âgées "G"). Les résultats préliminaires obtenus au cours de 1984 sont indiqués dans le tableau 64.

Tableau 64 - Les glucides des feuilles de pêchers (nmoles/mg de poids frais)
Le coefficient de variation maximum est de 0,208 pour 2 répétitions.
P=jeunes feuilles ; G=feuilles âgées.

Variétés :	2678 R		2678 S		GF 305		GS 2811	
feuilles :	P	G	P	G	P	G	P	G
concentrations:								
Saccharose	0,84	0,25	0,91	4,9	0,04	9,4	0,19	2,7
Glucose	5,5	6,4	7,9	3,2	16,3	5,1	22,2	2,0
Fructose	3,1	12,0	8,6	16,5	2,3	25,2	3,9	21,0
Rapports :								
Glc/Sacch	6,6	25,5	8,7	0,66	362	0,55	119	0,75
Glc/Fru	1,8	0,53	0,9	0,20	7,1	0,20	5,7	0,10
Fru/Sacch	3,7	47,9	9,5	3,4	50,7	2,7	20,8	7,7

Suite tableau 64 :

	P/G	P/G	P/G	P/G
Saccharose	3,36	0,18	0,004	0,07
Glucose	0,86	2,47	3,20	11,1
Fructose	0,26	0,52	0,09	0,18
Sac+Glc+Fru	10,3 18,9	18,4 29,6	18,7 49,0	26,4 28,4
	P/G=0,54	P/G=0,62	P/G=0,38	P/G=0,93

Ces données numériques font apparaître certains traits caractéristiques : la somme des glucides ne paraît guère reliée au caractère de résistance mais la distribution des composants individuels l'est davantage.

Dans la variété résistante, les jeunes feuilles contiennent proportionnellement plus de saccharose et moins de glucose que les feuilles âgées. Le fructose ne paraît pas être spécifiquement impliqué.

Dans l'hypothèse où les plus jeunes feuilles de la variété résistante et les plus âgées des variétés sensibles seraient "attractives" pour les pucerons, le saccharose pourrait, en effet, apparaître comme un facteur d'"appétence". Or les jeunes feuilles semblent rester plus "attractives" dans les variétés sensibles ; il y a là, sur ce point, une ambiguïté apparente, mais il convient de noter, également, qu'à l'époque (Août) où ont été effectués les prélèvements, la plupart des variétés sont devenues plus ou moins résistantes : le caractère de résistance paraît augmenter non seulement avec l'âge des feuilles, mais avec celui de l'arbre.

Il conviendrait donc d'examiner l'évolution biochimique au cours du développement des feuilles (jeunes → âgées) à plusieurs périodes comprises entre le printemps et l'été afin de vérifier si ces deux facteurs interagissent de manière significative.

Il s'agit d'un programme tout à fait intéressant et susceptible d'applications très concrètes, mais qui demande, évidemment, plusieurs mois de travail à temps plein, pour lesquels le laboratoire devrait percevoir une aide matérielle. Il est regrettable, à ce propos, que les dispositions récentes en matière de M.O.O. excluent, pratiquement, l'emploi temporaire de jeunes chercheurs. Le sujet pourrait donc être confié, par exemple, à un étudiant de DEA.

Tableau 65 - Fiche d'accompagnement des échantillons de feuilles de pêchers.

(INRA Zoologie-Bordeaux)

Echantillons de pêchers, prélevés le 23.08.1983 0,75

Présentation

- 1 sachet renfermant 2 sachets, marqués | ESSAIS (pour dosages proprement dits) PRELIMINAIRES (pour méthodologie du dosage)
- Les 2 sachets renferment 4 sachets, un par variété.
- Le sachet variété renferme 1 sachet par étage foliaire.

avec (P) : feuilles apicales (petites)
(M) : — moyennes.
(G) : feuilles basales (grosses)

- Par étage foliaire les répétitions ou sachets élémentaires renferment 1 gramme de feuillage.

(Récapitulatif)

Variétés	ESSAIS Etages foliaires	ESSAIS Répétitions (nombre)	PRELIMINAIRES Etage foliaire	PRELIMINAIRES Répétitions (nombre)
GF 305	P	3	M	2
S	G	3		
S. 2811	P	3		
	G	3	G	2
S. 2678 (S)	P	3	P	2
	G	3	G	2
S. 2678 (R)	P	3		
	G	3	G	2

Avec GF 305 = témoin de sensibilité.
— S. 284 = variété à résistance intermédiaire.
— S. 2678 (S)
— S. 2678 (R)

2678 × Redhaven → F1
AA aa | Aa × Aa

$\boxed{1/4\ AA + 1/2\ Aa} + \boxed{1/4\ aa}$

2678 (R) 2678 (S)

A = gène dominant contrôlant la réaction nécrotique, consécutive aux piqûres de l'insecte, associée à la résistance de S. 2678
a = gène récessif.

VI - LES TRAUMATISMES BIOCHIMIQUES VEGETAUX. (M. BOUNIAS)

Qu'il s'agisse de traumatismes d'origine pathologique, physique ou chimique (toxicologique), le protocole d'étude développé par le laboratoire reste le même : il s'agit toujours de traumatologie moléculaire. L'un des axes communs de recherches sur lesquels s'appuient ces programmes, consiste à établir une "carte" sémiologique des traumatismes biochimiques produits par des causes déterminées : c'est sur une telle base qu'ont été établies les conclusions finales du mémoire de fin de contrat avec le CNES. A des données expérimentales anciennes et récentes, ont été ajouté une série de données bibliographiques compilées à l'occasion de la préparation des cours à l'Université. Le chapitre est subdivisé de la façon suivante :

A - Radiations ionisantes
B - Facteurs d'éclairement
C - Inhibitions du métabolisme glucidique
D - Inhibitions des méthyl-transférases
E - Inhibitions des oxydations phosphorylantes
F - Inhibitions de la synthèse protéique
G - Inhibitions de la photophosphorylation
H - Effecteurs naturels
I - Traumatismes hydriques
J - Traumatismes thermiques
- Discussion
- Projets de recherches

A - Radiations Ionisantes.

Les perturbations observées au niveau des pigments photosynthétiques peuvent être examinées par comparaison avec celles produites dans les feuilles cotylédonaires d'Arabidopsis thaliana (crucifère) après exposition des graines à une irradiation (1). Les données numériques suivantes montrent qu'il est nécessaire d'appliquer une dose très importante de rayon : 10^6 rads, pour obtenir des altérations tout au plus équivalentes ou inférieures à celles observées dans les feuilles de Medicago.

Chlorophylle A	: - 30%	Lutéine	: - 30%
Chlorophylle B	: - 46%	Violaxanthine	: - 40%
β carotène	: - 20%		

Il apparaît, en outre, vers 250 K.rads, un composé rouge de mobilité comprise entre celle du β carotène et celle du phéophytines : ce composé, de polarité inférieure à celle des chlorophylles, et de spectre décalé vers les longueurs d'ondes croissantes (λ max ≃ 490 à 520 nm) paraîtrait correspondre plutôt à un dérivé réduit de la chlorophylle A, tel que celui décrit par KRASNOVSKII (2), caractérisé également par une coloration rouge et une bande de Soret décalée à 525 nm. Un dérivé transitoire présentant un maximum d'absorption à 475 nm a d'ailleurs été décelé par ZIEGER et WITT (3) au cours de la réduction chimique de la chlorophylle A, ce qui confirme la relation entre réduction et effet bathochrome. L'action du rayonnement nucléaire ne présente donc pas d'analogie avec celle de la source énergétique impliquée dans le phénomène observé. Par contre, une intensification spécifique de la transformation des chlorophylles en phéophytines et des chlorophyllides en phéophorbides (par perte de Mg^{++}) pourrait être liée à l'action d'un champ énergétique de type électrique.

B - Facteurs d'éclairement.

a) Atténuation de lumière

Chez l'Orge et chez l'Arabidopsis, l'atténuation de lumière abaisse les concentrations des pigments ainsi que des glucides et augmente celles des amino-acides. La durée d'atténuation paraît fonction de la longueur des cycles biologiques : 5h chez l'Arabidopsis et 17h chez l'Orge sont nécessaires pour produire des effets de même sens. La leucine et l'iso-leucine s'accumulent davantage chez la dicotylédone (+300%)(1) que chez la monocotylédone (leu : + 176%) mais dans ce dernier cas, l'augmentation globale des amino-acides leur reste inférieure (+86% dont + 130% pour ASn)(4).

(1) BOUNIAS, 1973. A.I.S. (Göttingen), **10**, 26-27
(2) KRASNOVSKII, 1948. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, **60**, 421
(3) ZIEGER & WITT, 1961. Z. Physik. Chem., **28**, 286
(4) BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat, Doct. ès Sc., Op. cit., p. 43-86

Les chutes de teneurs pigmentaires sont de l'ordre de -30 à 50% avec récupération partielle si le traitement est prolongé (cette récupération peut être totale dans le cas de la chlorophylle B chez l'Orge, après 17 heures sous 9,5 lux : la chl.B semble donc impliquée dans un processus de compensation.

b) Reverdissement après étiolements.

Après un étiolement de longue durée (8 jours) à basse température (15°C), sous lumière atténuée (≃ 10 lux), des plants d'Orge placés à 3000 lux reverdissent et retrouvent, après 3 jours, des teneurs normales en chlorophylles, caroténoïdes, glucose, amino-acides (ΣAA) sauf la leucine qui reste 43% au dessous de la normale du fait de l'intense activité de carboxylation.

Après un étiolement court (4 jours ½) à l'obscurité **totale**, les plantes replacées sous 3000 lux retrouvent plus lentement leurs caractéristiques biochimiques normales : au bout de 2 jours ½, les concentrations en chlorophylle A restent faibles (chl.A : -57% ; βC : -29% ; chl.B : normale) les amino-acides augmentent (+157%) ainsi que le glucose, dans de moindres proportions (+25%). la leucine libre reste faiblement concentrée pour la même raison que ci-dessus (-57%).

C - Inhibition du métabolisme glucidique.

L'ion $F^{\ominus}$ (NaF) inhibe la formation de pyruvate, l'activité des adénylate-cyclases d'algues vertes (1) et celle de nombreuses enzymes (animales et bactériennes) liées au métabolisme énergétique gluco-lipidique. Chez l'Orge, après 3 jours de traitement (30mM dans le milieu nutritif), l'asparagine tend à diminuer de même que tous les pigments photosynthétiques. Le glucose ne varie pas (±3%) et le fructose baisse de 35%, tandis que les diholosides augmentent, principalement le maltose (+900%).

Le fluoro-acétate est un inhibiteur de la formation de citrate, et en particulier de la malate synthétase (2).

Administré pendant 7 jours à la dose de 30mM dans le milieu nutritif, il baisse les teneurs pigmentaires, accumule les amino-acides dans de moindres proportions que $F^{\ominus}$ (+25% au lieu de +95%) sans modifications pour la leucine (-8%) et accumule également le glucose (+84%) ainsi que le fructose (+56%) qui sont produits par la photosynthèse mais non consommés dans le cycle de Krebs. Les diholosides augmentent également, mais contrairement au cas de $F^{\ominus}$, c'est le saccharose qui est le plus affecté (+1000%).

(1) KEIRNS et al., 1973. Life Sci., 13, 287.
(2) DIXON & KORNBERG, 1962. Meth. in Enzymol., 5, 633

D - Inhibition des Méthyl-transférases.

Les sulfamides bloquent le fonctionnement de l'acide folique par compétition avec l'acide para amino-benzoïque. La sulfaguanidine, à la concentrations de 4,7 mM dans le milieu nutritif, a été appliquée pendant 1 mois. Les analyses effectuées après 14 jours et 21 jours ont effectivement montré un blocage total de la synthèse du glycocolle (teneur = zéro) avec accumulation de son précurseur, la sérine (+228% après 14 jours et +834% après 21 jours). Les pigments photosynthétiques sont abaissés (chl.A : -22% à 14 j. et -48% à 21 j.) et les amino-acides augmentés (+175% à 14 j. et +450% à 21 j.) ; parmi ceux-ci, l'iso-leucine (+500%), le tryptophane (+550%) et la leucine (+85%) à 21 j. seulement, ainsi que l'asparagine (800 à 1000% dès le 14e jour). Le glucose augmente également (+20% à 14 j. et +127% à 21 j.) mais surtout le saccharose (700% à 14 j., **4000%** à 21 j. !). Le fructose augmente de 90% à 21 j.

Un phénomène très important est à signaler : l'apparition d'un dérivé oxydé du β carotène (spectre décalé vers les courtes longueurs d'ondes et polarité accrue de 28% sur support alumine) après 21 jours de traitement. Sa concentration représente alors 87% de celle du β carotène.

E - Inhibition des oxydations phosphorylantes.

Le di-coumarol inhibe la formation d'ATP (1) ainsi que le fonctionnement des oxydo réductases à NAD et NADP (2)(3). Une concentration de 80 mM a été maintenue dans le liquide nutritif de 14 à 21 jours. Les pigments photosynthétiques sont légèrement abaissés (chl.A : -11% à -14%) et les amino-acides augmentent de 45% à 14 jours mais il **diminuent** globalement de 10% après 21 jours. C'est le premier cas d'inversion de la relation entre chlorophylles et amino-acides. La concentration de la leucine est abaissée de 50% et celle de l'asparagine de 66% après 21 jours. Le glucose libre augmente assez sensiblement (71% et 43%), de même que le fructose (+150%) et le saccharose (300% à 1000%).

(1) GARLAND et al., 1977. Br. J. Pharm., **61**, 237
(2) BRAGG, 1965. BBA, **96**, 263
(3) HOLLANDER et al., 1975. Arch. Biochem. Biophys., **169**, 560.

F - Inhibition de la synthèse protéique.

L'aza-8-guanine inhibe la synthèse des polyribosomes par incorporation dans l'ARN (1), la synthèse protéique en général (2), celle de l'ADN (3), et celle de la riboflavine (4), ainsi que l'incorporation de leucine dans le foie de rat (5).

Une concentration de 20 mM dans le milieu nutritif, pendant 14 et 21 jours a provoqué l'apparition d'une quantité d'oxy-carotène (21 jours) correspondant à 60% de la teneur en β carotène, soit moins que sous l'action du sulfamide. Les concentrations pigmentaires sont maintenues ou augmentées (chl.A +2%, βC +32%) à 14 jours, tandis qu'elles baissent très sensiblement à 21 jours (chl.A : -44% ; chl.B : -55% ; β carotène : -16% seulement). Les amino-acides libres s'accumulent fortement à 14 jours (+390%) à l'exception de la leucine et de l'iso-leucine qui sont peut-être impliquées dans une stimulation de la photosynthèse comme tentative de compensation des carences protéiques. Il s'agit du second cas de non respect de la relation entre chlorophylles et amino-acides. De même, après 21 jours, alors que les teneurs pigmentaires diminuent, les concentrations en amino-acides sont proportionnellement moins augmentées qu'à 14 jours (+240%). L'asparagine est celui qui subit les plus fortes accumulations.

Le glucose connait la plus forte augmentation enregistrée jusqu'ici, avec : +140% à 14 jours et +260% à 21 jours, de même que le saccharose avec : +2200% à 14 jours et +5600% à 21 jours. Le fructose augmente nettement moins qu'avec le sulfamide.

G - Inhibition de la photophosphorylation.

Le para-chloro-mercuri-benzoate (pCMB) est un inhibiteur assez spécifique de la photophosphorylation lorsqu'il est administré à faibles concentrations (50 µM) (6). Plus récemment, il a été montré qu'il inhibe l'action des prostaglandines PGE1 dans la thyroïde de boeuf ; la dose 100 µM entraîne 15% d'inhibition (7). A doses plus élevées, le pCMB inhiberait également les transferts d'électrons. Administré à la dose de 30 µM

(1) WEBB, 1967. BBA, **138**, 307
(2) ZIMMERMANN, 1968. BBA, **157**, 378
(3) CLERC, 1965. BBA, **108**, 5
(4) AMMEDIA et al., 1975. BBA, **385**, 51
(5) KWAN & WEBB, 1970. Br. J. Pharm., **61**, 237
(6) ISAWA & GOOD, 1969. Int. Congr. Ph. S. Res., **III**, 1288
(7) MOORE & WOLFF, 1973. J. Biol. Chem., **248**, 5705.

dans le liquide nutritif pendant 14 jours, il provoque l'apparition d'un dérivé oxydé du carotène (polarité accrue de 43%). Les chlorophylles sont peu affectées (-10 à -11%) tandis que le β carotène augmente de 73%. Son dérivé oxydé représente 15% de la forme normale. Les amino-acides sont pratiquement invariants, tandis que les glucides augmentent : saccharose : 407% ; glucose : +95% ; fructose : +66%.

H - Effecteurs naturels.

La leucine est impliquée dans les processus de contrôle de la photosynthèse (voir chap. précédent, p.68). Son incorporation dans la cellule végétale provoque différents types d'effets liés aux concentrations présentes au niveau de certains sites particuliers (1). A faibles doses, elle stimule les phosphatases et accroît les concentrations en chlorophylles, tandis qu'à fortes concentrations (18mM), les effets sont inversés (2). Un analogue stérique de la leucine, la L-aza-4-leucine, induit des effets opposés à ceux de la forme naturelle (3). Au cours de ces mécanismes, les relations entre amino-acides et chlorophylles se maintiennent si l'on exclut l'asparagine qui constitue manifestement la principale forme de stockage des fonctions amines en excès, par suite de la pénétration de leucine exogène. Les glucides, saccharose, glucose, fructose, s'accumulent aux concentrations inhibitrices, en même temps que le β carotène (+15%) qui est accompagné d'un dérivé oxydé (70% de la teneur en forme réduite) dont le spectre est décalé vers les faibles longueurs d'ondes (-5nm) et la polarité réduite de 47%, sur couches d'alumine (4). Ces effets sont donc assez comparables à ceux du pCMB et confirment donc la localisation des traumatismes primaires au niveau du métabolisme énergétique lié à la photosynthèse. Nos travaux sur le rôle de la leucine sont étayés, par ailleurs, par ceux de BABADZHANOVA et coll. (5), qui ont confirmé son action au niveau de l'intensité des échanges gazeux photosynthétiques.

I - Traumatismes hydriques.

Chez les espèces sensibles, la carence hydrique provoque un affaiblissement de la photosynthèse et de la photophosphorylation, sans action

(1) BOUNIAS, M., 1974. A.I.S. (Frankfurt), **11**, 21-23 et compl., **12**
(2) BOUNIAS, 1976. 2nd Int. Symp. Arabid. Res. - A.I.S. (Frankfurt), **13**, 96-104
(3) BOUNIAS & PACHECO, 1974. C.R. Acad. Sci. (Paris), **279D**, 691-694
(4) BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat, Op. Cit., p. 109 et suivantes
(5) BABADZHANOVA et al., 1971. Dokl. Akad. Nauk. Tadzh. SSR, **14**, 50-52

découplante, avec diminution des teneurs en chlorophylles et protéines (1)(2). la baisse des concentrations protéiques explique certainement les augmentations de teneurs en amino-acides libres constatées (3), quoique celles-ci soient parfois plus prononcées dans des variétés résistantes. Au cours du reverdissement qui suit le choc hydrique, le photosystème II manifesterait des signes d'inhibition (2).

Les péroxydases et catalases diminuent (4)(5) tandis que l'acide abscissique s'accumule (5) ce qui peut expliquer la baisse de synthèse des chlorophylles et d'activité de la Ru-di-P-Case (6).

Au cours de la sénescence, une baisse des glucides et une augmentation de la proline seraient accentuées par la turgescence, par opposition au flétrissement (7).

Enfin, la carence hydrique entraîne une augmentation accompagnée de modifications de la composition des phospholipides (8)(9) se traduisant par des altérations irréversibles de la structure des membranes (8).

J - Traumatismes thermiques.

Le froid réduit l'activité photosynthétique ainsi que les teneurs en chlorophylles (10) et perturbe le métabolisme des ARNm et ARNt (11) ; par contre, son action sur la dissociation des phospholipides est discutée (12) sauf, peut-être à températures très inférieures à 0°C où les membranes subissent des dégâts (13).

Plus intéressant, dans le cas des échantillons de Trans, est le résultat de l'action de températures anormalement élevées (40 à50°C pendant des durées de quelques minutes à 4 heures). L'incorporation de CO_2 est inhibée et le ribulose 1-5-diphosphate s'accumule (14) ; la vitesse de renouvellement métabolique du saccharose décroît, tandis que les

(1) MAYORAL et al., 1981. Austr. J. Plant Physiol., **8**, 385-393
(2) BHARDWAJ et al., 1981. Plant Cell Physiol., **22**, 155-162
(3) THAKUR, 1982. Environ. Exp. Bot., **22**, 221-226
(4) GURGUL et al., 1980. Zesz. Nauk. Akad. Roln Szczecinie, **85**, 33-42
(5) THAKUR, 1981. New Phytologist, **89**, 25-32
(6) POPOVA et al., 1981. Fiziol. Rasten. (Sofia), **7**, 29-35
(7) AGATSUMA et al., 1981. Plant Cell Physiol., **22**, 683-688
(8) CHETAL et al., 1980. Phytochemistry, **19**, 1393-1395
(9) HITZ et al., 1981. Plant Physiol., **68**, 814-822.
(10) STAMP, 1980. Z. Pflanzenphysiol., **99**, 75-83
(11) GASPARIKOVA, 1981. Biologia (Bratislava), **36**, 207-213
(12) RODIONOV, 1981. Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast., **13**, 411-415
(13) STOUT, 1981. Plant Physiol., **68**, 248-251
(14) WEIS, 1981. Deut. Bol. Ges., **94**, 135-142.

concentrations en glucose, fructose et saccharose augmentent globalement sans modifications de leurs proportions relatives ; parallèlement, la photosynthèse est réduite et les amino-acides s'accumulent, principalement l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'alanine (1).

Au laboratoire, nous avons analysé les conséquences d'un flétrissement résultant d'un chauffage à 120°C pendant 2mn30 (durée nécessaire pour obtenir un effet extérieurement visible dans ces conditions) sur l'équipement pigmentaire photosynthétique de feuilles de pissenlit.

Les analyses effectuées aussitôt après le choc thermique, avant que l'effet de dessèchement, accompagnant la mort des cellules, se fasse sentir de manière significative (moins de 3% dans nos essais), ont donné les résultats indiqués dans le tableau 66, illustré par la figure 56.

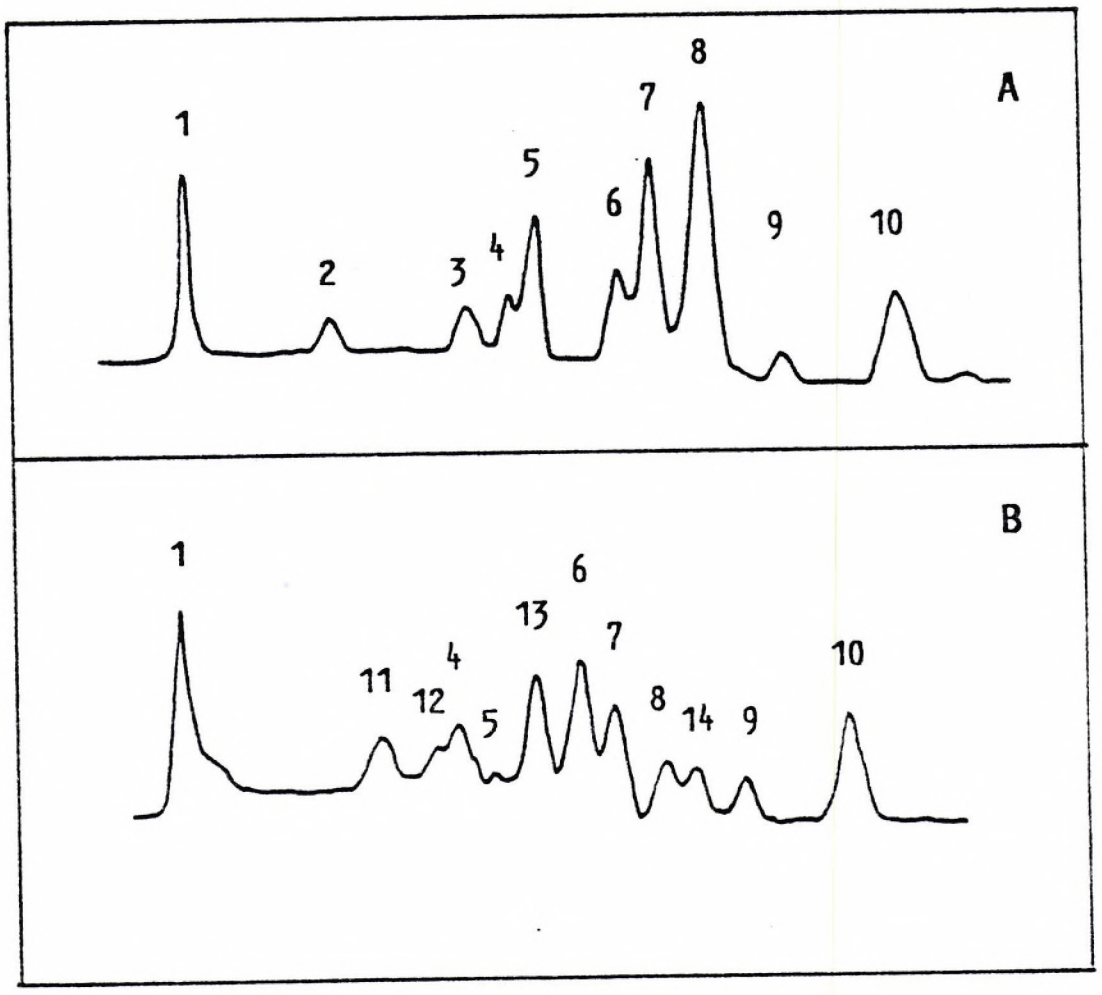


Figure 56 - Action d'un échauffement avec dessèchement sur l'équipement photosynthétique.

A - Spectre normal
1 - Dérivés porphyriniques polaires
2 - Dérivé Xanthophyllien
3 - Chlorophyllide
4 - Type Zéaxanthine
5 - Lutéine
B - Spectre altéré
11 - Chlorophyllides nouveaux
12 - Chlorophyllides nouveaux
6 - Chlorophylle A' (allomère)
7 - Chlorophylle B
8 - Chlorophylle A
9 - Phéophytine A
10 - β carotène
13 - Chlorophylle B' (allomère)
14 - Phéophytine A'

(1) CHICHEV, 1980. Fiziol. Rast. (Sofia), 6, 3-13.

Tableau 66 - Action d'un choc thermique sur l'équipement pigmentaire photosynthétique de feuilles.

Composants	Témoins	Traités
β carotène	0,071 ± 0,017	0,069 ± 0,013
Chlorophylle A	0,315 ± 0,008	0,055 ± 0,019
Chlorophylle B	0,172 ± 0,043	0,095 ± 0,000
Phéophytine A	0,036 ± 0,009	0,051 ± 0,005
Lutéine	0,107 ± 0,026	0,0013±
Type Zéaxanth.	0,042 ± 0,010	0,083 ± 0,010
Chlorophyllides (3)	0,052 ± 0,013	cf. pic 12
Chld. pic 11	0,00	0,073 ± 0,0065
Chld. pic 12	-	0,037 ± 0,015
Chlorophylle A'	0,088 ± 0,022	0,154 ± 0,003
Chlorophylle B'	0,00	0,092 ± 0,005
Phéophytine A'	0,00	0,068 ± 0,008

Ces résultats montrent un phénomène général d'oxydation avec conversion des chlorophylles en formes d'allomérisation oxydante, disparition de la lutéine au profit de formes plus polaires, création de dérivés porphyriniques voisins des chlorophyllides. D'autre part, la phéophytine A n'augmente que de 30%, ce qui paraît relativement peu.

Il est curieux de constater que de tels phénomènes ont été constatés dans tous les échantillons de la 2e série (J+40) mais pas dans ceux qui ont été prélevés aussitôt après l'événement (E_1). Ceci nous inclinerait à penser, d'une part, qu'un choc thermique ne peut expliquer les effets primaires constatés à (J+1) et d'autre part, que les allomérisations chlorophylliennes observées à (J+40), y compris à d=10m, peuvent provenir d'une cause totalement étrangère à (E_1).

DISCUSSION

L'un des points importants à discuter est la différence entre l'expression immédiate du traumatisme, aussitôt après l'intervention du facteur (E_1)(1ère série : J+1) et l'état de sa dérive après une période de "stabilisation" métabolique (2ème série : J+1).

"L'état de choc" initial présente certaines caractéristiques rappelant un traumatisme d'origine hyperthermique : augmentation simultanée des amino-acides, (dont Glu et Ala) et du saccharose. Par contre le glucose et le fructose diminuent, ce qui ne se rencontre que par suite d'un affaiblissement de la photosynthèse (par étiolement à l'obscurité totale sur une durée de quelques heures) ou par l'action de $F^{\ominus}$ qui inhibe le métabolisme du glucose-1-P (1), mais aussi les phosphorylase-phosphatases (2) et les adénylate-cyclases (messagers de la glycogénolyse) (3)(4)*. Le dessèchement expliquerait également un accroissement des teneurs en amino-acides, mais il affecterait davantage le photosystème II, alors que les chlorophylles B sont, ici, relativement moins touchées que les chlorophylles A.

Il est possible de conclure à un effet primaire au cours duquel un facteur thermique a pu intervenir, s'ajoutant à une altération de la glucogenèse correspondant à un blocage photosynthétique mais non imputable à la désactivation de la Ru.1-5-di-P carboxylase telle que nous l'avions observée chez l'Arabidopsis et chez l'Orge, avec libération de leucine.

L'évolution ultérieure de l'état traumatique biochimique des plantes situées à des distances rapprochées de l'épicentre du phénomène (E_1) ne montre aucun faisceau d'analogies avec des effecteurs connus, exceptés le di-coumarol. Il n'a pas été observé d'oxy-carotène, ce qui écarte l'hypothèse d'une action comparable à celle du pCMB ou de la leucine (qui est d'ailleurs diminuée à l'épicentre). La plupart des inhibiteurs, ainsi que la chaleur et le dessèchement augmentent les amino-acides, le saccharose et le fructose, ce qui n'est pas le cas ici. L'action du di-coumarol provoque des effets très comparables (chloro-

(1) STEVENS-CLARK et al., 1968. J. Biol. Chem., 243, 4468
(2) GORIS et al., 1972. BBA, 268, 158
(3) KEIRNS et al., 1973. Life Sci., 13, 287
(4) HARWOOD et al., 1973. J. Biol. Chem., 248, 4901.

*Il y a alors équilibre entre la non-production et la non-consommation du glucose.

phylles, amino-acides, leucine comprise, glucose) à l'exception du fructose qui varie peu et du saccharose qui baisse : ces deux caractéristiques rappellent l'effet d'étiolement, précisément sur les deux composants glucidiques où il ne se manifestait pas dans les extraits de la première série, puisque seul le glucose y était abaissé.

L'état biochimique des plantes exposées au phénomène (E_1), après 40 jours, présente donc des signes compatibles avec certains symptômes de perturbations des oxydations phosphorylantes.

PROPOSITIONS DE RECHERCHES

Il est évident que de nouveaux essais de simulations doivent être réalisés avec d'autres effecteurs chimiques plus récemment étudiés, et sélectionnés tout particulièrement sur un critère de spécificité. D'autre part, les effets de gradients observés dans de nombreux cas, évoquent l'hypothèse d'un agent dont l'efficacité diminue avec l'éloignement de la source, ce qui serait compatible avec une énergie physique (radiante). Il nous paraît donc indispensable d'analyser les effets de divers types de rayonnements, en particulier électro-magnétiques. L'action de tels rayonnements sur la cellule vivante est encore mal connue; elle n'en est pas moins certaine, comme le montrent diverses recherches expérimentales (12 publications russes, 10 américaines et anglaises, 2 japonaises, 1 française (1) et 1 italienne (2) entre 1980 et 1981) et théoriques (3). Il nous paraîtrait extrêmement important d'axer, en particulier, un programme de recherche vers l'analyse du SPECTRE D'ACTION des paramètres de champs sur les propriétés cinétiques des systèmes enzymatiques fondamentaux. Il est en effet, concevable que les fonctions métaboliques soient assujetties à des facteurs potentiels régulatoires de nature purement physique, dont les mécanismes peuvent être décortiqués élément par élément, puis analysés à des échelles physiologiques progressivement élargies (du système biochimique isolé in vitro à l'organite cellulaire puis à l'être vivant in toto). Outre leur aspect fondamental, de telles recherches sont susceptibles d'applications médicales (4)(5) et agronomiques (6).

(1) TORBET et al., 1981. Nature (Lond.), **289**, 91-93
(2) BELTRAME et al., 1980. Alta Frequenza, **XLIX**, 101-114
(3) VEVE et BOUNIAS, 1982. Rapp. Int. LBC, 63 pp.
(4) FITTON-JACKSON et al., 1980. Tissue Cult. Med. Res., Proc. Int. Symp., 2, 21-28
(5) KOLODUB et al., 1981. Kardiologiya, **21**, 82-85
(6) BOSC de VEZE, 1983. L'Electroculture. panorama Ed.

VII - TRAUMATOLOGIE BIOCHIMIQUE :

Suite et fin des recherches sous contrat avec le CNES sur l'"affaire de Trans-en-Provence".

Les recherches relatives à l'"affaire de Trans-en-Provence" ont maintenant abouti à leur terme.

Certaines hypothèses (frisant parfois le ridicule) ont été émises par des groupements dits "ufologiques" au sujet des causes possibles du phénomène observé à Trans-en-Provence. L'une d'entre elles suggère la possibilité de l'action de résidus de ciment. Or, la présence de ciment sous forme de poudre, de laitance ou de mortier relève de 1 à 3,7 unités la valeur du pH du sol. (Tableau 67).

Tableau 67 - Evolution des valeurs du pH d'un sol calcaire en fonction de la présence de ciment pur, dilué (laitance), ou mélangé à du sable siliceux (mortier).

1984		application sur la terre de :			laitance pure	
	Terre seule	poudre de ciment	laitance de ciment	mortier liquide	ciment	ciment + sable (1+3)
0	9,10	10,91	11,03	10,15		
2h	9,07	11,22	11,14	10,67		
4h						
6h						
24h					12,80	12,70

Disposant de la terre provenant des échantillons de la 2e série de mesures de 1981, nous avons pu en vérifier le pH (tableau 68) et le comparer à celui des prélèvements de 1983 : les valeurs moyennes sont respectivement au plus près de l'épicentre du phénomène, de 8,252 (N=5 ; σ=0,289) et 8,256 (N=5 ; σ=0,523) soit égales à ... $3{,}6.10^{-4}$ près, et inférieures de 4 unités de pH aux valeurs possibles après 24h de contact avec le ciment (au delà avec la "prise" du ciment, l'effet éventuel de "brûlure" disparait : l'action ultérieure se traduit plutôt par une stimulation de croissance.

Tableau 68 - Mesures des valeurs initiales et de l'évolution du pH dans les échantillons de terre correspondant aux stations végétales de la 2e série.

1981	distance (m) du point central					eau
Temps	0	1,5	2,10	3,50	10	déionisée
0	8,78	8,93	-	8,86	8,43	6
2h	8,31	8,48	-	8,39	8,02	
4h	8,14	8,16		8,31	7,92	
6h	8,09	8,09		8,23	7,93	
24h	7,94	8,05		8,10	7,66	7

Enfin, des "experts" anonymes ont été chargés par certains détracteurs d'attaquer le rapport provisoire (Note technique n°16) : les commentaires effectués par ces "experts" dénotent une méconnaissance de la réalité expérimentale, associée à un manque d'objectivité, ce qui est de "bonne guerre", compte tenu de la finalité de la démarche, mais aussi, ce qui paraît plus grave, un certain manque de compétence dans le domaine considéré.

Il ne sera répliqué, par voie de **publication**, à ces critiques, que dans le cas où celles-ci seraient rendues publiques sous la signature de leurs auteurs.

VIII - PROJETS DE RECHERCHES

Ce chapitre résume l'ensemble des projets et propositions formulés à la suite de divers appels d'offres, ou à l'appui de demandes de bourses, dans le domaine de la biochimie végétale.

A - Rappelons (pour mémoire, car non mentionnés dans le C.R. 1983) :

◊ 1 projet présenté conjointement en 1983 en **association** avec le laboratoire de Physiologie et Pathologie végétales de l'Université d'Avignon :
"Déterminismes cellulaires et moléculaires de l'induction systémique de résistance hôte/parasite chez les Végétaux d'intérêt Agricole"
(ATP inra du secteur végétal liée à la demande d'association entre le laboratoire de Biochimie et le laboratoire de

de Physiologie et Pathologie Végétales de l'Université d'Avignon (dossier en cours d'instruction)

◊ 1 projet présenté, au titre 1983-1986, conjointement avec le laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales de l'Université d'Avignon :
(appel d'offres CEE : rubrique 2-3-2 "Résistance des cultures aux maladies")
"Recherches biochimiques : comparaison des modifications de l'équipement photosynthétique et des glucides, lors de la contamination de solanacées en fonction des caractères de résistance variétale ou induite par effecteurs chimiques et biologiques (éliciteur)"
Coopération prévue avec un pays EVD : Rwanda

◊ 1 projet présenté en association avec l'Université d'Avignon suite à l'appel d'offre CNRS sous le titre d'ATP : "Interaction entre Plantes et micro-organismes" et sur le thème : "déterminisme et expression de la résistance" (offre sans suite).

B - PROJETS NOUVEAUX

a) Appel d'offres du secrétariat d'Etat chargé de l'Environnement et de la Qualité de la vie : "Méthodologie en écotoxicologie des produits chimiques" (Fév. 84)

A - RENSEIGNEMENTS ADMINISTRATIFS.

Titre de la soumission : (Catégorie : A. essais biologiques)
Sémiologie biochimique informatisée en écotoxicologie

Thème : (Catégorie : Intoxications brèves : a) méthodes faisant intervenir des critères d'intoxication fonctionnels sublétaux)
"Caractérisation des traumatismes biochimiques végétaux"

Sous-thème : Mise au point d'un protocole général informatisé.

Désignation du contractant :
- Institut National de la Recherche Agronomique
- 149, rue de Grenelle, 75341, Paris cédex 07
- Tél. (1) 550.32.00
- N° SIREN : 180070039
- Forme juridique : Etablissement public à caractère scientifique et technique non marchand.
- Représenté par son Président Directeur Général (M. Jacques POLY)

Désignation du laboratoire devant effectuer les études : LABORATOIRE DE BIOCHIMIE, (Département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie)
Centre de Recherches d'Avignon, BP 91, Domaine St Paul, 84140, Montfavet, Tél. 16(90)88.91.45
Directeur : Michel BOUNIAS, Docteur ès Sciences, Maître de Recherche.

Désignation du responsable scientifique : Michel BOUNIAS, Maître de Recherches, chargé de cours magistraux de Biochimie et de Statistiques Biologiques à la Faculté des Sciences de l'Université d'Avignon (2e cycle : licence de Phytoprotection) - LABORATOIRE DE BIOCHIMIE, Centre de Recherche d'Avignon, B.P. 91, Domaine St Paul, 84140, Montfavet, tél. 16(90)88.91.45, poste 316
Collaborateurs techniques : Mme DAURADE M.H. (3B)
Mme BARESTE N. (5B)

Durée souhaitée du contrat : 24 mois

Durée souhaitée pour sa prise d'effet : 1/1/85

Montant de l'étude (coût total) T.T.C. : 491.000 F (Equipement + Fonctionnt + bourses

---

Montant de la participation demandée (T.T.C.) : 118.000 F.

Intitulé et numéro de compte auquel les fonds seraient versés : Agent Comptable de l'INRA
Compte n° 9061-82-L-PARIS

B - RENSEIGNEMENTS TECHNIQUES.

---

1 - Justifications du programme de recherche.

1.1 à 1.3 - Situation actuelle et bibliographique du sujet : l'étude biochimique des effets toxicologiques non intentionnels d'agents agropharmaceutiques ou xénobiotiques divers (anthropogéniques ou non) a fait l'objet, jusqu'ici, de nombreuses recherches isolées et ponctuelles. De nombreux agents, physiques et chimiques peuvent provoquer l'apparition de certains symptômes non spécifiques voire contradictoires lorsqu'ils sont considérés isolément. Ainsi, par exemple, les radiations ionisantes peuvent soit augmenter, soit diminuer les concentrations des pigments photosynthétiques (SOLEDAD et al., 1980, An. R. Acad. Farm., 46, 209-216). Les chocs hyper thermiques altèrent la photosynthèse et accumulent les amino-acides libres (CHICHEV, 1980. Fiziol. Rast. Sofia, 6, 3-13). Mais ce même type d'effets peut-être obtenu par un choc hydrique (déssèchement) (MAYORAL et al., 1981, Austr. J. Plant Physiol., 8, 385-393) (THAKUR, 1982, Environ. Exp. Bot., 22, 221-226). Les traumatismes salins augmentent les glucides chez les monocotylédones, mais pas chez les di-cotylédones (GORHAM, 1981, Physiol. Plant, 53, 27-33). Les substances herbicides elles-mêmes sont généralement étudiées sur des cibles biochimiques très ponctuelles (fluorescence chlorophyllienne, cytochrome P450 ...) qui ne sont que rarement mises en relation avec d'autres facteurs métaboliques plus généraux. Enfin, la rubrique "Phyto-toxicité" des revues bibliographiques reste particulièrement pauvre, même en 1984 : or, il est significatif que soient en train de se développer des études sur les antidotes contre les herbicides (MARTIN, 1983 : Ciba-Geigy Patentschrift (SWITZ.)CH 637.268) et d'autres sur la phytotoxicité de substances chimiques contenues dans les sols (CARBALLEIRA, 1982, An. Edafol. Agrobiol., 41, 2287-94). Ces substances pouvant être d'origine naturelle ou anthropogénique, il paraît,de toute manière,nécessaire d'aborder la phytotoxicologie selon un protocole d'intérêt aussi large que possible.

1.4 - Sur ce sujet, l'INRA a déjà envisagé l'élaboration d'un système informatisé de détermination des causes d'anomalies observées sur matériel végétal, mais il ne s'agit nullement d'une approche biochimique, ce dont le présent projet a pour but d'établir les bases.

1.5 - Une première phase avait été réalisée de 1965 à 1971 à propos de l'action des rayons gamma chez les végétaux, dans le cadre d'une bourse CEA (INSTN). Les résultats ont abouti à la possibilité de caractériser les perturbations métaboliques par comparaison de certaines inter-relations biochimiques fonctionnelles normales et traumatiques (BOUNIAS, 1972 : thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, LYON 1 n°98)(cf. liste complète des publications : n°2 à 23). Par la suite, de 1981 à 1983, ce travail a été repris dans le cadre de contrats financés par le Centre National d'Etudes Spatiales (CNES-Toulouse : contrats n° 80.0796 et 83.009) dans le but de caractériser des traumatismes d'origine indéterminée.

Cette seconde phase a été réalisée dans les conditions écologiques naturelles et non pré-déterminées, tandis que la première consistait en une démarche expérimentale en conditions strictement contrôlées au laboratoire. Dans les deux cas, les analyses effectuées sur Hordeum vulgare et Arabidopsis thaliana (en culture artificielle), ainsi que sur Medicago minima (en biotope naturel) ont fait apparaître des relations fonctionnelles entre les pigments photosynthétiques, les glucides et les amino-acides, (cf. liste complète des publications : n°6-8-11-20-21-22-23), ainsi que des propriétés de certaines enzymes (BOUNIAS & PACHECO, 1972, C.R. Acad. Sc., 275D, 201-204 et 1974, C.R. Acad. Sc., 279D, 691-694). L'étude de l'action d'effecteurs physiques et chimiques a montré, en outre, qu'il était possible de mettre en évidence des modifications significatives de ces relations fonctionnelles en liaison avec des phénomènes de toxicité (BOUNIAS, 1983. C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 12, 75-87 et : Mémoire final de contrat CNES, 1984, 109 pp.)

Enfin, les mêmes bases devraient pouvoir être utilisées pour étudier les phénomènes de résistance des Végétaux à des parasites ou pathogènes, en relation avec le Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales de la Faculté des Sciences de l'Université d'Avignon (Directeur, Professeur Ph. J. COULOMB). Les premiers résultats sont en cours de publication (BOUNIAS et COULOMB, 1984: Can. J. Bot., **62**, sous presse, et thèses de 3e cycle en préparation).

2 - Plan de recherche.

2.1 - Objectif général des travaux et études.

Informatisation de la caractérisation mathématique des relations fonctionnelles normales et de l'analyse statistique de leurs déviations d'origines traumatiques déterminées ou à déterminer.

2.2 - Programme des travaux.

Les données recueillies au cours des recherches antérieures constituent une base de départ. Il convient d'y ajouter les résultats d'analyses quantitatives des pigments photosynthétiques, des glucides, des amino-acides et de certaines enzymes (phosphatases en particulier), après traitement des plantes par un ensemble d'effecteurs métaboliques affectant aussi spécifiquement que possible chacune des principales fonctions biochimiques. La méthodologie biochimique a été mise au point dans chaque cas par nanochromatographie en couche-mince (cf. publications M. BOUNIAS : n°4-31-58-69 et 1 livre paru chez Masson en 1983 : réf. n°66). Le traitement des résultats numériques par l'informatique aura pour but de caractériser l'amplitude des variations (analyse de variance) et leur sens (corrélation et régression) en leur associant, dans chaque cas, les probabilités calculées d'après les équations de distributions adéquates. Il devrait en résulter un ensemble de critères sémiologiques biochimiques dont la spécificité sera déterminée par les paramètres statistiques et leurs degrés de signification.

Le même principe de traitement informatisé pourra être étendu, par la suite, avec l'incorporation des résultats d'analyse d'autres composants biochimiques, en particulier les dérivés terpénoïdes et les substrats phosphorylés, en cours d'étude par HPLC.

Les critères enzymologiques complémentaires seront inclus sur la base des recherches cinétiques théoriques et expérimentales déjà développées au laboratoire (BOUNIAS, publications n°37-46-47-89...).

L'échelonnement des travaux ne sera donc pas conditionné par l'achèvement de la mise au point d'une technique particulière, ni de l'application d'un effecteur de référence donné : le projet constitue un ensemble "modulaire" permettant une édification progressive non soumise à des facteurs limitants (autres que la disposition des instruments techniques et des personnels d'exécution).

Intérêt des recherches pour le développement de la discipline. le succès du projet permettrait de fournir à l'expertise écotoxicologique végétale la possibilité non seulement de démontrer objectivement la présence ou non de symptômes traumatiques (sur des bases mathématiques et physiques) mais également de formuler des hypothèses, par comparaison avec l'action d'effecteurs connus, sur la nature métabolique, voire même les cibles-initiales, des altérations constatées (remonter à la cause à partir des effets). Ceci peut s'appliquer non seulement aux pollutions générales d'origine industrielle, mais également à celles dues à l'emploi des produits agropharmaceutiques (effets non intentionnels).

Intérêt pour d'autres disciplines. Cette recherche de type sémiologique biochimique pourrait être directement étendue à la détermination de troubles d'origine pathologique, ainsi qu'aux recherches sur l'optimisation des pratiques agricoles. Compréhension de phénomènes généraux: L'établissement des interactions fonctionnelles pourra être mis en relation avec les voies métaboliques connues, et faire apparaître, dans des cas traumatiques ou pathologiques, des voies compensatrices encore mal connues, en relation éventuelle avec les phénomènes de résistance induite. Nous prévoyons l'extension de ces recherches à l'échelle des constituants cellulaires isolés et purifiés ; l'ensemble entre dans le cadre d'une collaboration déjà établie avec le Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales du Professeur COULOMB. Nous envisageons également d'appliquer le même schéma de principe à des recherches toxicologiques développées chez l'Insecte, soit dans le sens de la protection (travaux du laboratoire sur la biochimie de l'Abeille), soit dans le sens de la lutte (recherches sur la biochimie du Moustique, en relation avec l'Université de Montpellier : Laboratoire de Pathologie des Invertébrés du Professeur VAGO).

- Possibilités de recherches appliquées : mécanismes de résistance des végétaux aux agresseurs pathologiques ou anthropogéniques. Contribution à l'étude du mode d'action des herbicides et de leurs antidotes, chez les plantes à combattre et celles à protéger.

- Travaux précédemment faits par le laboratoire.

  Ces travaux ont déjà été résumés dans le paragraphe 1.5
  Les recherches les plus récemment effectuées par le laboratoire ont porté sur l'exploitation statistique "manuelle" des résultats, et sur la recherche de relations fonctionnelles dans les conditions de terrain. Ils se complètent par leur extension à l'étude des mécanismes de résistance de végétaux à des pathogènes.

- Contacts prévus ou prévisibles avec les laboratoires français et étrangers travaillant dans le même domaine.

POUR L'INFORMATIQUE : DR. J.P. PETIT, Maître de Recherche au CNRS, Directeur-adjoint du Centre de Calcul de l'Université de Provence, Université d'Aix-Marseille III.

POUR LA PHYSIO-PATHOLOGIE CELLULAIRE VEGETALE : Professeur Ph. J. COULOMB, Directeur du Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales, Université d'Avignon, Faculté des Sciences.

EXTENSION PREVISIBLE DES RECHERCHES.

Le protocole de recherches pourrait être étendu au domaine de la Pathologie des Invertébrés, en relation avec la station de pathologie comparée de St-Christol-les-Alès (INRA/CNRS) dirigée par M. le Professeur VAGO, Membre de l'Institut, et qui comprend précisément un secteur de Recherches sur les effets secondaires des pollutions se traduisant par l'apparition de maladies microbiennes secondaires. La mise en relation de ces phénomènes avec des équations doses/effets biochimiques serait d'un grand intérêt.

Une collaboration utile pourrait également découler de ce programme, avec les autres laboratoires du Département de Phytopharmacie de l'INRA travaillant sur les pesticides, et en particulier les herbicides.

b) Appel d'offres INRA/CNRS "chimie fine", thème "Messagers chimiques".

PRE-PROJET

ACTION THEMATIQUE PROGRAMMEE
Objectif : "chimie fine"
Thème : Messagers chimiques

TITRE DU PROJET :

"Implication de médiateurs glucogéniques végétaux dans une induction systémique de résistance"

Responsable du Projet : Michel BOUNIAS, Maître de Recherche, Directeur adjoint de la station de Phytopharmacie (INRA-AVIGNON)
Laboratoire de Biochimie, Domaine St Paul, B.P. 91, F84140, Montfavet.

Laboratoires collaborant au projet :

1 - Laboratoire de Biochimie (INRA-Phytopharmacie)
Directeur : M. BOUNIAS, Docteur d'Etat, Maître de Recherche

2 - Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétéles (Fac. des Sc., Univ. d'Avignon), 33, rue Louis Pasteur.
Directeur ; Ph. J. COULOMB Docteur d'Etat, Professeur

3 - Laboratoire de Pathologie Végétale (INRA-Avignon, Domaine St Maurice)
P.M. MOLOT, Docteur d'Etat, Maître de Recherche

4 - Laboratoire de Chimie Bio-Organique (Fac. des Sc., Univ. d'Avignon)
Directeur : A. PAVIA, Docteur d'Etat, Professeur

5 - Laboratoire de Chimie Organique Biologique (Fac. des Sc., Univ. d'Avignon)
Directeur : J.L. KRAUS, Docteur d'Etat, Professeur

RESUME DU PROJET

A - Situation actuelle et travaux déjà réalisés par le groupe d'Avignon.

Au cours des interactions Hotes/Parasites, certaines molécules provenant d'un pathogène sont "élicitrices" de la synthèse de phyto-alexines par l'hôte (1)(2)(3). Ces substances peuvent présenter une activité anti-fongique ou fongistatique, comme nous l'avons montré dans le cas de l'action du capsidiol sur les membranes de Phytophthora, parasite du piment (Capsicum)(5). Mais dans le cas d'une induction par voie systémique, nous avons observé que la résistance se manifeste sans production de capsidiol (4)(6)(7), et que certains processus comme la stimulation des péroxydases ne lui sont eux mêmes associés qu'indirectement (7). Il est important de remarquer également le contraste entre la toxicité du capsidiol (8) ou des extraits de feuilles induites par systémie ascendante (9) et l'innocuité des préparations élicitrices (8) sur des préparations de protoplastes isolés del'hôte.

Enfin, nous avons montré que les glucides sont fortement impliqués au cours des manifestations comparatives de l'infection dans des variétés sensibles et résistantes de Capsicum (10).

B - Développements du programme.

Au modèle Capsicum (dicotyledone), nous nous proposons d'adjoindre Hordeum (monocotylédone) comme modèle complémentaire pour l'étude fondamentale des médiateurs glucogéniques, en raison de l'expérience antérieurement acquise sur ce matériel (11). Le projet portera sur deux voies convergentes abordées simultanément.

1 - Aspect fondamental - Recherche de médiateurs glucogéniques fonctionnant en complément ou en alternative à la glucogenèse photosynthétique. La participation possible de l'adénylate cyclase sera examinée en premier lieu, compte tenu de corrélations négatives récemment observées entre l'AMPc et le βcarotène (12) chez des organismes unicellulaires.

2 - Recherches pathologiques associées. L'implication des systèmes glucogéniques ci-dessus sera analysée au cours de l'induction de résistance, et parallèlement, la mise en oeuvre des systèmes de reconnaissances par les récepteurs membranaires sera étudiée par voie cytochimique.

La recherche de médiateurs glucogéniques et d'inducteurs de résistance fera appel à la synthèse de molécules nouvelles, à partir des structures naturelles ayant montré une réponse significative, dans le but de potentialiser leur action et de favoriser leur pénétration par les racines ou par les feuilles, selon les cas.

BIBLIOGRAPHIE

1 - N. KEEN, J. PARTRIDGE et A. ZAKI, 1972. Phytophathology, 62, 768-772

2 - P. ALBERSHEIM et B.S. VALENT, 1978. J. Cell. Biol., 78, 627-643

3 - M. YOSCHIKAWA, K. YAMAUCHI et H. MASAGO, 1978. Plant Physiol., 61, 314-317

4 - P.M. MOLOT, P. MAS, M. CONUS, H. FERRIERE et P. RICCI, 1981. Physiol. Plant Pathol., 18, 379-389

5 - M. TURELLI, C. COULOMB, Ph. J. COULOMB, J.P. ROGGERO et M. BOUNIAS, 1984. Physiol. Plant Pathol., 24, "sous presse"

6 - M. TURELLI, C. COULOMB, Ph. J. COULOMB et S. MUSTACHIEV, Can. J. of Bot., "comité de lecture"

7 - C. COULOMB, P.M. MOLOT, P. MAS, Ph. J. COULOMB et M. BOUNIAS, 1983. C.R. Acad. Sci., III 296, 225-230.

8 - C. POLIAN-BOUIN et Ph. J. COULOMB, 1984. C.R. Acad. Sci. "sous presse"

9 - C. POLIAN-BOUIN, C. COULOMB et Ph. J. COULOMB, Can. J. of Bot., "en cours de rédaction".

10 - M. BOUNIAS, C. COULOMB et Ph. J. COULOMB, 1984. Can. J. Bot., "sous presse"

11 - M. BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat de Doctorat ès Sciences. LYON I, n°98

12 - KRISTKII et coll., 1981. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 258, 759-762.

c) Appel d'offres INRA/CNRS : ATP "Physiologie de la croissance et du développement des Végétaux ligneux".
Thème : "Résistance au stress. Prédispositions d'ordre physiologique aux attaques de scolytes".
Titre du projet : "Recherches de critères décrivant l'état physiologique des pins et mesure de leurs variabilités en vue de déterminer l'éventuelle susceptibilité de certains pins aux attaques de xylophages".

Projet présenté par le professeur Lévieux (Université d'Orléans et Zoologie forestière INRA)

Le laboratoire de Biochimie a été sollicité au début de l'été 1984 pour une étude comparée des glucides du liber d'arbres situés dans diverses conditions physiologiques et génétiques, par le laboratoire des médiateurs chimiques (Mme Frérot). C'est par ce biais qu'il a été crédité de 15.000 F. au titre de l'ATP.

C - PROPOSITIONS DE SUJETS DE THESES

a) Projet soumis au CNES (et copie à M. le Ministre de la Recherche, comme ancien directeur du CNES) par le laboratoire de Biochimie.

◊ Objet - Recherche d'effets biochimiques caractéristiques de l'action de paramètres électromagnétiques incidents.

◊ Matériel Vivant : végétaux en cultures artificielles p. ex. Arabidopsis thaliana (crucifère) de taille réduite à l'état adulte (20mg par plant), contenus en tubes de verre de Ø 25 mm hauteur ≃ 150 mm

ou : Hordeum vulgare (graminée) au stade 1ère feuille (même contenant, poids : 150 mg)

ou : Medicago sp. (par analogie avec les sujets des contrats CNES 1981 et 83).

◊ Sources de rayonnements : Les paramètres d'intensité et de fréquence doivent pouvoir être contrôlés de manière à constituer un spectre d'activité (à terme). 1ère étape : ordre de grandeur du GHz (à discuter).

◊ Paramètres biochimiques : Pigments photosynthétiques, glucides, amino-acides, enzymes (phosphatases) :
- variations individuelles en fonction des paramètres de la source
- modifications des inter-relations fonctionnelles selon ces mêmes paramètres.

(Expérience antérieure : 27 publications chez les Végétaux
66 publications chez les Insectes)
- Relations "doses/effets" : recherche de mécanismes du type pharmacologique : activation → inhibition.

◊ Première phase (1 an).

- Etude complète pour 1 fréquence* appliquée avec des intensités variables

◊ Calendrier des recherches.

Sur les 3 années : biliographie permanente : Chem. Abstr. disponibles au Laboratoire + accès aux banques de données internationales par terminal sur le Centre d'Avignon

1ère année

Détermination des paramètres biochimiques normaux chez les plantes témoins cultivées en conditions artificielles contrôlées à mettre au point au Laboratoire : cycles biologiques, évolution et variabilité des paramètres biochimiques : pigments photosynthétiques (7 composés environ) glucides (15 à 18 composés) amino-acides libres (16 à 20 composés), phosphatases neutres (propriétés cinétiques non michaeliennes) : 6 mois

Techniques : nano chromatographie quantitative sur couche mince
"HPLC" (chromatographie liquide à haute pression)
spectrophotométrie - Cinétique enzymatique "en continu"
(toutes opérationnelles au laboratoire)

Modifications comparatives des paramètres biochimiques dans les plantes témoins et soumises à des intensités extrêmes (2 valeurs x 2 temps de latence, témoins compris). Durée : 6 mois, calculs inclus.

2ème année

Modifications des paramètres biochimiques sous l'action d'intensités de valeurs intermédiaires : 2 valeurs x 2 temps de latence : 6 mois.

Action d'intensités extrêmement faibles : 2 valeurs x 2 temps de latence; témoins compris (6 mois).

3ème année

Calcul des corrélations caractéristiques des relations fonctionnelles normales et traumatiques entre paramètres biochimiques pris 2 à 2. Détermination des équations de régression linéaire en coordonnées naturelles ou transformées (dans les cas de non-linéarité) pour chaque corrélation ayant une valeur statistiquement significative (6 mois).

Rédaction du mémoire : interprétation physiologique des résultats obtenus, en termes de relations métaboliques (6 mois).

◊ Moyens matériels.

1 - Equipements fournis par le Laboratoire de Biochimie.

- Nanochromatographie en couche mince (salle des cuves, applicateurs, étuves, spectro-densitomètre CS930 et photomètre PHI-5, etc.), valeur actuelle : 230.000 F.

(*) Selon les générateurs disponibles en matériel transportable.

- Spectrophotométrie enzymologique : LERES SPILA et VITATRON	150.000 F.
- HPLC, "Step gradient", détection UV-visible (Waters)	90.000 F.
- Petites fournitures, verrerie, centrifugeuse, micro-seringues, etc ...	20.000 F.
- Stock réactifs, étalons purifiés (+ réfrigérateurs et congélateurs)	30.000 F.
Total	520.000 F.

2 - Moyens demandés

2-1 - Equipements à obtenir en prêt pour une durée de 2 ans :

- source génératrice de champs électro magnétiques

2-2 - Bourse-thèse (nouveau régime)

- ordre de grandeur : 60.000 F/an x 3 ans = 180.000 F.
  au titre de : 1985-1986-1987.

b) Projet soumis au Département de Phytopharmacie.

Le projet ci-dessous s'appuie sur une idée ancienne qui m'avait été suggérée par les premières démonstrations des analogies de régulations hormonales de l'Abeille et des Vertébrés : l'unité biochimique du Vivant est telle que j'avais alors (1975) émis l'hypothèse qu'elle devait s'étendre, même chez les Végétaux, aux mécanismes glycogénolytiques de types adrénergiques ou peptidergiques. Les applications en seraient importantes, en particulier dans le domaine traumatologique moléculaire.

INRA-Dépt. de Phytopharmacie et Ecotoxocologie
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
Centre de Recherches d'AVIGNON
B.P. 91, 84140 - MONTFAVET

- M. BOUNIAS -

PROJET DE RECHERCHES

(Sujet de thèse "nouveau régime")

Titre : Action de l'AMP cyclique et des Adrénergiques sur les glucides libres chez le Végétal.

Objet : Recherche d'analogies éventuelles entre les effecteurs hyperglycémiques animaux et glucogéniques végétaux ; Application à l'intervention des processus régulatoires glucogéniques dans certains phénomènes de résistance.

Plan de Recherche et Calendrier

- Mise au point des techniques de culture en conditions artificielles sur milieu synthétique : 2 mois

- Détermination des paramètres biochimiques liés entre eux par corrélations positives : glucides et pigments photosynthétiques
  [ou négatives : amino-acides et pigments photosynthétiques]*.

- Etude préliminaire chez les plants témoins sur toute la durée du cycle végétatif utilisable pour les expériences (environ 5 séries de prélèvements) : 6 mois

- Détermination de la variabilité biologique et des relations fonctionnelles normales : 2 mois

- Administration d'AMP cyclique et mesure des paramètres biochimiques au bout de 2h, 4h, 16h, 32h, 48h.

  ◊ essai avec 2 à 3 doses différentes (en série exponentielle)
  ◊ administration en phase éclairée
  ◊ administration en phase d'obscurité totale de durées croissantes : 2h, 4h, 16h, 32h, 48h pour obliger la plante à libérer les hypothétiques stimulis glucogéniques non-photosynthétiques, vraisemblablement bloqués par le fonctionnement des voies glucogéniques photosynthétiques (cf schéma ci-joint) durée minimale : 1x3x6 = 18 mois.

- Epreuve avec l'Adrénaline et 1 ou 2 autres effecteurs à déterminer en fonction des résultats antérieurs :

  ◊ protocole à choisir en fonction des conditions optimales ci-dessus, durée : 3 effecteurs x 1 dose x 1 durée : 3 mois (ou variantes : 1x3x1, etc ...)

- Compléments expérimentaux suggérés par les résultats antérieurs : 2 mois

- Rédaction du mémoire : 3 mois

[* à inclure seulement si les techniques HPLC permettent une analyse rapide].

SCHEMA RESUMANT LES HYPOTHESES DE TRAVAIL

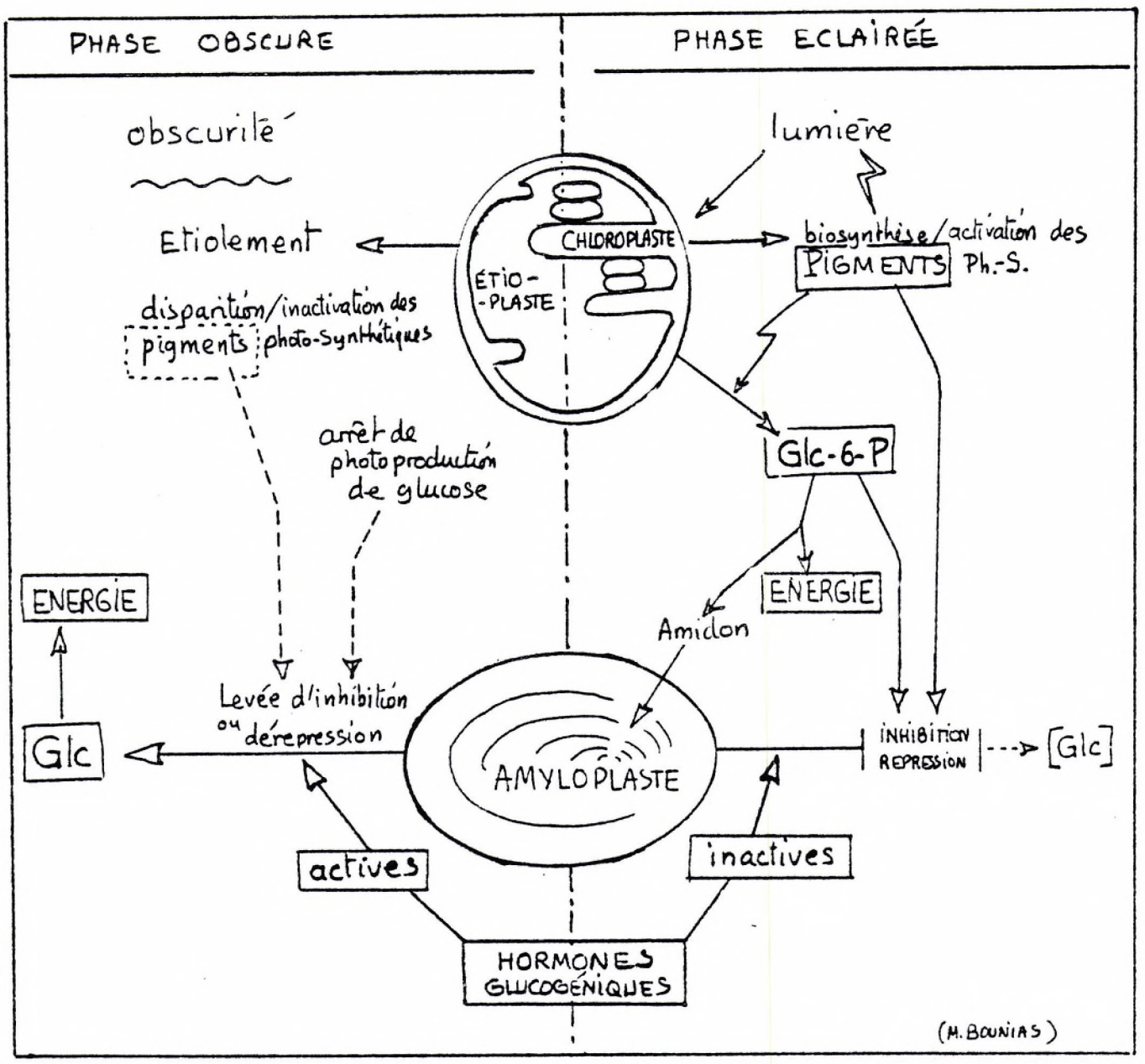


Fig. 57

Ces recherches seront mises en pratique au fur et à mesure que des "créneaux" de temps seront dégagés.

Quatrième Partie

ACTIVITES ANNEXES

I - Relations avec la Profession apicole.

A diverses reprises des entretiens ont eu lieu avec des responsables de CIVAM (M. carretier, M. Gilles ...) au sujet des difficultés actuelles de l'Apiculture. Au cours de la "semaine de l'Apiculture" en Avignon (Avril), une conférence a été donnée au Palais des Papes le 6 Avril sous le titre : "Recherche en Biochimie : relations Homme/Abeille" (Dr. M. BOUNIAS). Le texte en sera publié par la Revue Française d'Apiculture.

II - Visites de Personnalités Extérieures.

Le laboratoire de Biochimie a reçu, du 4 au 6 Juillet 1984, la visite du Professeur GLINSKI, de l'Académie de LUBLIN, envoyé en visite officielle par le gouvernement Polonais. Les travaux du laboratoire de Biochimie sont considérés comme oeuvre de pionnier par les chercheurs Polonais, qui s'orientent vers la caractérisation immunologique des protéines de l'Abeille.

III - Thésaurus et programmation de la Recherche au Département de Phytopharmacie et Ecotoxicologie.

Le laboratoire a apporté sa contribution à l'édification du Thésaurus du Département, dont l'intérêt a dû ensuite s'effacer devant les projets de programmation de la recherche. Le Dr. BOUNIAS a participé à diverses réunions et élaboré des éléments de dossier en vue de la préparation du document final, achevé fin 1984.

IV - Enseignement supérieur.

Enseignements généraux en 2e cycle (licence de Phytoprotection): U.V. Physiologie et Biochimie Végétale : cours de Biochimie (15h).

V - Interventions radio-télévisées.

Participation du Dr. BOUNIAS à diverses émissions : "Adrénaline", (Fr. Inter : Jacques Pradel), "Boulevard de l'Etrange" (Fr. Inter : Jean-Yves Casgha) "Temps X" (TF 1 : Marceau Ginesis), "Droit de réponse" (TF 1 : Michel Polac), colloque de Radio-France au studio 105 (Fr. Inter : J.Y. Casgha, Ant. 2, etc ...), radios régionales, radios "périphériques", etc ...

VI - Conseil Scientifique du Parc Naturel Régional du Luberon.

Participation du Dr. BOUNIAS aux séances de travail du C.S. ainsi qu'aux réunions extraordinaires relatives à l'aménagement forestier du territoire, avec les communes et l'O.N.F. .

VII - Stages

Une innovation est à noter, cette année : le laboratoire a été sollicité pour l'accueil en stages de courte durée (4 jours) d'élèves des classes de 3e des CES au titre de contact avec les milieux professionnels en vue de permettre aux élèves de réfléchir en connaissance de cause à leurs idées d'orientation. (Stages Mlle Daumergue et M. Eloy).

Mlle Lorient a été accueillie à diverses reprises, dans le cadre de la préparation de sa thèse (Université d'Avignon).

M. Nizeyimana a terminé la phase expérimentale de ses travaux et entrepris la rédaction de son mémoire de thèse (Université de Montpellier) .

Mlle Thé à été reçue en stage de courte durée pour des analyses de gibbérellines, dans le cadre de son mémoire de fin d'études de licence.

Mme Frérot a passé plusieurs semaines au laboratoire pour collaborer à l'analyse des glucides du Pin sylvestre.

VIII - Formation et Responsabilités du Personnel du laboratoire.

◊ Madame DAURADE (3B) a reçu diverses formations complémentaires sous forme de stages et de cours :

- informatique : cours + T.P. "initiation au mini 6" et initiation au langage Fortran
- CNAM : ½ UV TP chimie générale (acquise)
- HPLC : 1 semaine (Sté Waters, Paris)

Elle a été désignée, au niveau du département, comme responsable "informatique" du laboratoire, et chargée, à ce titre, de préparer son équipement futur en ordinateurs, en particulier pour la documentation et les calculs du type étalonnages exponentiels et statistiques.

◊ Madame BARESTE (5B) a continué à mettre en pratique sa formation dans la pratique du traitement de textes ainsi que de l'emploi du télex. Elle a également suivi des stages d'évaluation, dans le cadre de la formation permanente par unités capitalisables, en Français, Mathématiques et Sciences (chimie, mécanique, électricité), ainsi qu'une initiation à l'intégration "manuelle" des pics sur enregistrements chromatographiques.

Elle a assuré, comme précédemment, les opérations de gestion générale du laboratoire et la création des fiches bibliographiques.

◊ L'équipe permanente du laboratoire de Biochimie est beaucoup trop réduite pour pouvoir continuer à faire face aux sollicitations. L'état de saturation, déjà dénoncé depuis plusieurs années, est largement dépassé : toute opération nouvelle abordée dans ces conditions le serait au préjudice de la qualité : c'est un risque que le laboratoire se refuse totalement d'accepter : il a donc été décidé d'un accord unanime qu'aucun dossier nouveau ne serait ouvert avant que chacune des opérations précédentes ait été conduite à son terme de manière complète et définitive.

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - Exercice Budgétaire 1984*

◊ **Les dépenses de fonctionnement** ont été réparties comme indiqué dans le tableau 68 ci-dessous.

Tableau 68 - Fonctionnement 1984

Chapitres	Désignation	Engagements de dépenses
606-3(1)	Fourn. Entr. petit Mat. Equip.	13.398,73
606-3(2)	Produits chimiques	5.940,01
606-4	Fourn. Administratives	9.247,40
606-5	Linge et vêtements de travail	365,94
615-54	Entr. Répar. Mobilier et Matériel	2.652,41
618-3	Documentation technique	13.021,54
625-11	Déplacements en France	10.545,62
626	Affranchissement	3.182,40
628-28	Charges externes diverses	749,0
Photocopies		4.385,20
Téléphone		3.781,40
Total		66.269,65
M.O.O. (femme de ménage)		8.800,00 (budget commun)

Les attributions initiales se répartissent comme suit :

Dotation initiale	:	55.000,00
Subvention CIES	:	12.390,00
Crédit téléphone	:	1.140,00
Total	:	68.530,00

Soit au bilan : un reliquat de 2.260,35 F. en fonctionnement
un déficit de 8.800,00 F. en M.O.O. du à l'absence d'attribution de M.O.O. au laboratoire de Biochimie.

(*) Etabli avec la collaboration de Mme Bareste

◊ La répartition des **dépenses d'équipement** est précisée dans le tableau 69.

Tableau 69

Désignation	Montants
Pré-colonne "HPLC"	2.205,00
Centrifugeuse Jouan	28.850,00
Fluorimètre/CS930	13.100,00
Détecteur réfractométrique HPLC	17.676,65
Total	61.831,65

Les attributions initiales ont été réparties comme suit :

Reliquat de 1983	:	37.334,05	
Crédits 1984	:	12.000,00	(sur 70.000 F/station)
ATP 1984	:	12.650,00	(après prélèvement % de l'administration)
Total	:	61.984,05	

Soit au bilan, un reliquat de + 152,40 F.

Les engagements de dépenses suivants, sur bons de commande 1984, sont reportés sur l'exercice 1985.

Chapitre	montant
606-3 (1)	2.100,00
618-3	1.623,00
Total	3.723,00

II - Prévisions pour 1985

◊ **En fonctionnement**, compte tenu du recrutement d'un ingénieur 3A dont une partie de l'activité est financée par le laboratoire, une dotation supplémentaire de 20.000 F. serait nécessaire, ainsi qu'un crédit d'au moins 10.000 F. en M.O.O. et stages.

NB*Aucune dotation extérieure, type CIES ne sera perçue en 1985.

◊ **En équipement** : les besoins de première urgence se distribuent de la façon suivante :

- 1 filtre de sorbonne	2.500
- 1 enregistreur double canal pour HPLC	15.000
- 2 supports CCM en quartz pour analyses en U.V.	7.000
- 2 colonnes HPLC	5.000
- 1 support adaptateur HPLC	10.000
- 1 groupe de purification de l'eau	33.000
- 1 sorbonne amovible	15.000
Total :	87.500

Prévisions de 2e urgence :

- 1 ensemble de séparation et purification des protéines	80.000
- 1 spectro photomètre (remplacement d'un appareil ancien [≃15 ans] à réformer)	100.000
- 1 chambre de cultures	120.000
Total	300.000

◊ **En locaux.** Les 97 m^2 actuels, dont 52 m^2 de laboratoires sont notoirement insuffisants.

Les dossiers scientifiques et bibliographiques représentent à eux seuls un volume important auquel il est nécessaire de pouvoir recourir en permanence avec le minimum de perte de temps : cela suppose un classement à la fois rigoureux et suffisamment "aéré" : or il manque pour cela au moins 15 m^2 de locaux.

Les surfaces de "paillasses" et de tables sont entièrement occupées par le matériel : il manque au moins 2 m^2 par pièce occupée, soit 10 à 15 m^2 de surface libre pour permettre d'étaler les documents de travail tels que : enregistrements de chromatogrammes, etc ...

La seule et unique sorbonne du laboratoire est occupée à plein temps par les opérations de révélation des plaques C.C.M. et ne peut en aucun cas recevoir d'installations fixes pour des manipulations de chimie : l'installation d'une seconde sorbonne est devenue indispensa-

ble, et doit être réalisée soit sur une paillasse, soit sous forme "mobile". Dans les deux cas, il est indispensable qu'un local supplémentaire soit libéré dans le périmètre du laboratoire, au rez-de-chaussée.

CONCLUSION

Le laboratoire de Biochimie a poursuivi sa production scientifique à un rythme élevé, en exploitant des techniques déjà mises en oeuvre au cours des années précédentes, quoique constamment améliorées au fil des expérimentations : des résultats très positifs en ont été tirés, aussi bien dans le domaine de la régulation du métabolisme de l'abeille et de la toxicologie que dans celui des interactions entre les plantes et leurs parasites ou pathogènes. La source est loin d'être tarie, et ce genre de recherches peut se poursuivre encore longtemps, avec profit, à partir des mêmes moyens.

Toutefois, de tels programmes vont sortir maintenant de ce que l'on peut considérer sensu stricto comme de la "**Recherche**" pour entrer dans une phase de "**Valorisation par l'application**" : il paraîtrait donc plus judicieux de les confier, au moins partiellement, à une équipe d'ingénieurs et techniciens, de façon à libérer, par ailleurs, le temps de travail nécessaire à un retour à la recherche "conceptuelle" proprement dite.

Je ressents, maintenant, pour ma part, comme une nécessité intellectuellement vitale, le besoin de consacrer un temps considérablement plus important à la mise à jour (a partir de synthèses bibliographiques, en particulier) des connaissances les plus fondamentales nécessaires pour développer des idées et des théories nouvelles dans le domaine des interactions moléculaires, c'est-à-dire, en entrant progressivement davantage vers la biophysique.

C'est, en effet, ce domaine de la science qui me paraît appelé à reculer, dans un proche avenir, certaines limites que ne vont pas manquer d'atteindre les autre voies d'approche, aussi avancées soient-elles. Or, les moyens matériels qui pourront être attribués au laboratoire dans ce proche avenir ont peu de chance de satisfaire les besoins réels : il sera donc nécessaire de compenser par ... des idées d'autant plus fécondes !

Achevé le 14 Février 1985

M. BOUNIAS
Docteur ès Sciences

LISTE DES PUBLICATIONS 1984

BOUNIAS M., COULOMB C. & COULOMB Ph. J. - 1984 - Relationships between free carbohydrate levels and resistance or susceptibility of Capsicum annuum to Phytophthora capsici. **Can. J. Bot.**, 62, 1036-43.

TURELLI M., COULOMB C., COULOMB Ph. J., ROGGERO J.P. & BOUNIAS M. - 1984 - Capsidiol effects on the lipid and protein content of isolated membranes of Phytophthora capsici. **[Physiol. Plant Pathol.]**, 24, 211-221

BOUNIAS M., DEMONGEOT J. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Damped oscillations in induced trehalase and hemolymph trehalose resulting from dietary inputs of sucrose or trehalose. **IRCS Med. Sci., Key Reports in Molecular and Cellular Biology.** 12, 546-547

BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Induction of Honeybee haemolymph sucrase activity by high levels of dietary sucrose. **Comp. Biochem. Physiol.**, 79B(1), 75-80

BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Adaptation of honeybee haemolymph α-glucosidase to changing physiological requirements by transitions in the Hill coefficient. **Int. J. Biochem. (G.B.)**, 16(8), 939-941

BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Formes moléculaires comparées des tréhalases, saccharases et p.N.P. α-D-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles après induction des saccharases par le saccharose per os. **C. R. Soc. Biol.**, 178, 29-37.

BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Haemolymph levels of carbohydrates and sucrase activity in honeybees fed on trehalose. **I.R.C.S. Medical Sciences, Key reports in Molecular and Cellular Biology.** 12, 769-770.

BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Short-term induction of honeybee haemolymph disaccharidase following trehalose injection. **Comp. Biochem. Physiol.**, sous presse

BOUNIAS M. DUJIN N. & POPESKOVIC D. - 1984 - Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroïd : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alk. phosphatases of the honeybee. **Pestic. Biochem. Physiol.**, sous presse

BOUNIAS M. - 1984 - Recherche en Biochimie et relations Homme/Abeille. C. R. Coll. Sem. Rég. Apic., Avignon, 6 Avril 1984. **Rev. Fr. Apic.** sous presse

BOUNIAS M. - 1984 - L'affaire de l'OVNI de Trans-en-Provence et le rôle de l'INRA, ou : l'application d'un programme de recherches sur la caractérisation des traumatismes végétaux à l'étude des dismétabolismes consécutifs à un phénomène d'origine inconnue. **Journal du C.N.R.A.**, n°8, 1-6-7.

BOUNIAS M., MOREAU R. & GOURDOUX L. - 1984 - Action de l'insuline endogène sur la glycémie de l'abeille, et interaction de la somatostatine de Vertébrés. **C. R. Soc. Biol., 178,** 705-711.

BOUNIAS M. - 1984 - Corrélations fonctionnelles glucido-lipidiques dans l'hémolymphe d'Abeilles soumises au jeûne. **C. R. Acad. Sc.**, sous presse

BOUNIAS M. - 1984 - Effets anti-adrénergiques du propranolol sur la glycémie de l'Abeille (Apis mellifera, mellifera, L.) in vivo. **C. R. Réunion commune des Sociétés de Biologie et de Chimie Biologique : Pharmacologie** :"aspects moléculaires et fonctionnels") (Université de Montpellier), 9 Nov. 1984, 2 pp., et : C.R. Soc. Biol., 6 p. Sous presse.

BOUNIAS M. - 1984 - Effets biochimiques comparés de l'injection des formes cycliques et linéaire de la somatostatine de Vertébrés chez l'abeille, in vivo. I - La glycémie. **C. R. Soc. Biol.**, 178, 627-632.

BOUNIAS M. - 1984 - Déterminisme électromagnétiques dans les fonctions biochimiques fondamentales : une nouvelle pharmacologie. **Colloque de Biologie théorique. (Sté Internationale de Biologie Mathématique, Fresnes, 6-12-84)** Publ. en cours.

COMPTE-RENDU ANNUEL DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE
Document tiré en 30 exemplaires
Déposé au Service Central de Documentation, CNRA-Versailles